

Aus der Kinderchirurgischen Klinik am Dr.-v.-Haunerschen Kinderspital

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich von Schweinitz

Proliferationsverhalten glatter Muskelzellen der menschlichen Harnblase

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Martin Mucke

aus

Flensburg

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Maximilian Stehr

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Alexander Roosen

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2013

Meinen Eltern

Inhalt

INHALT	4
1 EINLEITUNG	6
1.1 DIE MENSCHLICHE HARNBLASE	6
1.1.1 Anatomie und Histologie.....	6
1.1.2 Embryologie	7
1.1.3 Physiologie und Urodynamik	8
1.2 DIE INFRAVESIKALE OBSTRUKTION.....	10
1.3 ZYTOKINE UND INTRAZELLULÄRE SIGNALWEGE	12
1.4 DER PLATELET-DERIVED-GROWTH-FACTOR (PDGF)	13
1.4.1 Allgemeines	13
1.4.2 Klinische Bedeutung des PDGF.....	14
1.5 ANDERE WACHSTUMSFAKTOREN UND WEITERE ZIELGENE	16
1.6 REAKTIONEN GLATTER MUSKULATUR AUF MECHANISCHEN STREß	19
1.7 DIE ROLLE DES PDGF IM PROLIFERATIONSVERHALTEN GLATTER MUSKELZELLEN	21
2 ZIELSETZUNG.....	22
3 MATERIAL UND METHODEN.....	24
3.1 MATERIAL.....	24
3.1.1 Lösungen, Medien, Zusätze	24
3.1.2 Kulturmedien	25
3.1.3 Kits	25
3.1.4 Verbrauchsmaterial	25
3.1.5 Geräte:	26
3.1.6 Synthetische Oligonukleotide	26
3.1.7 Software.....	28
3.1.8 Datenbanken und Recherche.....	28
3.2 METHODEN.....	29
3.2.1 Zellkultur.....	29
3.2.1.1 Probengewinnung	29
3.2.1.2 Zellkultur	29
3.2.1.3 Trypsinieren/Splitten	30
3.2.1.4 Zellen zählen	30
3.2.1.5 Einfrieren von Zellen	30
3.2.1.6 Auftauen von Zellen.....	31
3.2.2 Immunfluoreszenzfärbung	31
3.2.3 BrdU-Proliferationsassay	32
3.2.4 Druckexperiment.....	33
3.2.5 RNA-Isolation.....	34
3.2.6 cDNA-Synthese	35
	4

3.2.7	<i>quantitative realtime-PCR</i>	36
3.2.8	<i>Auswertung:</i>	37
3.2.8.1	BrdU Proliferationsassay	37
3.2.8.2	quantitative realtime-PCR.....	37
4	ERGEBNISSE	38
4.1	IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG	38
4.1.1	<i>Detrusor</i>	38
4.1.2	<i>Trigonum</i>	38
4.2	BRDU PROLIFERATIONSASSAY	39
4.2.1	<i>Detrusor</i>	39
4.2.2	<i>Trigonum</i>	41
4.2.3	<i>Vergleich zwischen Detrusor und Trigonum</i>	43
4.3	DRUCKEXPERIMENT UND QUANTITATIVE REALTIME-PCR.....	45
4.3.1	<i>Detrusor</i>	45
4.3.2	<i>Trigonum</i>	51
4.3.3	<i>Vergleich zwischen Detrusor und Trigonum</i>	55
5	DISKUSSION	57
6	ZUSAMMENFASSUNG	65
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	67
	DANKSAGUNG	69
	LITERATURVERZEICHNIS	70

1 Einleitung

1.1 Die menschliche Harnblase

1.1.1 Anatomie und Histologie

Die Harnblase ist ein Sammel- und Ausscheidungsorgan, das im kleinen Becken lokalisiert ist. Der über die Niere ausgeschiedene Harn gelangt über die Harnleiter in die Blase, welche in der Lage ist, größere Mengen davon zu speichern, zurückzuhalten und auszuscheiden. Um diese Funktionen erfüllen zu können, verfügt sie über eine hohe Dehnbarkeit sowie verschiedene aufeinander abgestimmte Muskeln. Funktionell bildet die Blase eine Einheit mit der Urethra. Topographisch läßt sich vom restlichen Blasenkörper das sogenannte trigonum vesicae abgrenzen, welches anatomisch definiert ist als Dreieck zwischen den Harnleitermündungen und dem Harnröhrenabgang. An funktionell bedeutenden Muskeln gibt es zum einen den größten Blasenmuskel, den M. Detrusor, sowie den muskulären Anteil des trigonum vesicae, welche beide Bestandteile der Blasenwand sind. Weiterhin existiert eine glattmuskuläre Schicht im proximalen Teil der Urethra, welche auch als Blasen Hals bezeichnet wird, und den äußeren Harnröhrensphinkter. Der Harnröhrensphinkter ist der für die Kontinenz entscheidende Muskel. Er ist weiter distal im Verlauf der Urethra, etwa im Niveau des Beckenbodens gelegen und setzt sich aus intramuraler Harnröhrenmuskulatur, Anteilen der quergestreiften Beckenbodenmuskulatur (Mm. Perinei transversi superficialis et profundus, M. Levator ani) und Sphincter urethrae zusammen. Die periphere Innervation erfolgt sowohl über viszerale, als auch über somatische Bahnen. Somatische Fasern verlaufen über den N. pudendus (S2-S4) und über den Plexus pelvici (S2+S3). Die parasympathische Innervation erfolgt aus dem sakralen Miktionszentrum über den Plexus pelvici, die sympathische über die Nn. hypogastrici aus dem thorakalen Grenzstrang (Th10-L2).

Die zentralen Steuerungszentren liegen in der Großhirnrinde, im Kleinhirn und den Basalganglien. Die Bahnen verlaufen über das pontine Miktionszentrum und das Rückenmark zu den peripheren Nerven. [1-4]

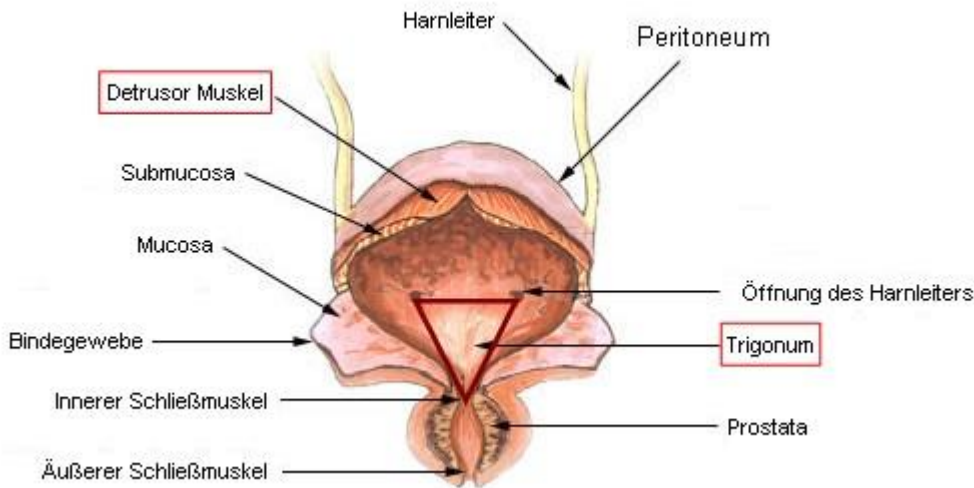


Abbildung 1.1: Anatomie der Harnblase (Mann) (Quelle: Wikipedia)

Histologisch besteht die Blasenwand aus einem Epithel (Urothel), darunter liegendem subepitheliale Bindegewebe und einer Tunica muscularis. Das Urothel besteht aus einem sog. „Übergangsepithel“, d.h. einem primär 5-10-schichtigen Epithel, das sich bei erhöhtem Blasenvolumen auseinanderzieht und dann aus weniger Schichten besteht. Dieser Mechanismus ist ursächlich beteiligt an der guten Dehnbarkeit der Harnblase bei über weite Strecken kaum verändertem intravesikalem Druck. Auch die subepitheliale Bindegewebsschicht und die Muskelschicht verschmälern sich bei Erhöhung des Blasenvolumens. Die Tunica muscularis besteht innen und außen aus längsverlaufender glatter Muskulatur und dazwischen aus überwiegend zirkulär verlaufenden glatten Muskelfasern. Sie lässt sich übergeordnet unterteilen in Anteile an Detrusormuskel, muskulärer Schicht des trigonum vesicae und innerem Sphinktermuskel. [5] [6]

1.1.2 Embryologie

Die Harnblase des Menschen entwickelt sich embryologisch aus zwei verschiedenen Anteilen. Zum einen entwickelt sich aus der sich in der 4. Schwangerschaftswoche septierenden Kloake das Rektum und der Sinus urogenitalis aus dem sich der größte Anteil der Harnblase, sowie beim Mann die Prostata und Teile der Harnröhre, bei der Frau die gesamte Harnröhre und die äußeren Geschlechtsorgane entwickeln. Etwa zur selben Zeit entstehen die Ureterknospen, die dem Mesoderm entstammen. Die Ureteren inserieren im Verlauf ihrer Entwicklung in die sich

entwickelnde Harnblase und wandern nach kranial. Das von den Ureteren abstammende Gewebe bildet das Trigonum vesicae, welches sich über den Bereich zwischen den Uretermündungen und Harnröhrenabgang erstreckt. Somit entstammen die Gewebe der Blasenwand im Trigonum anderen embryonalen Anlagen als der Rest der Harnblase. [1, 7-9]

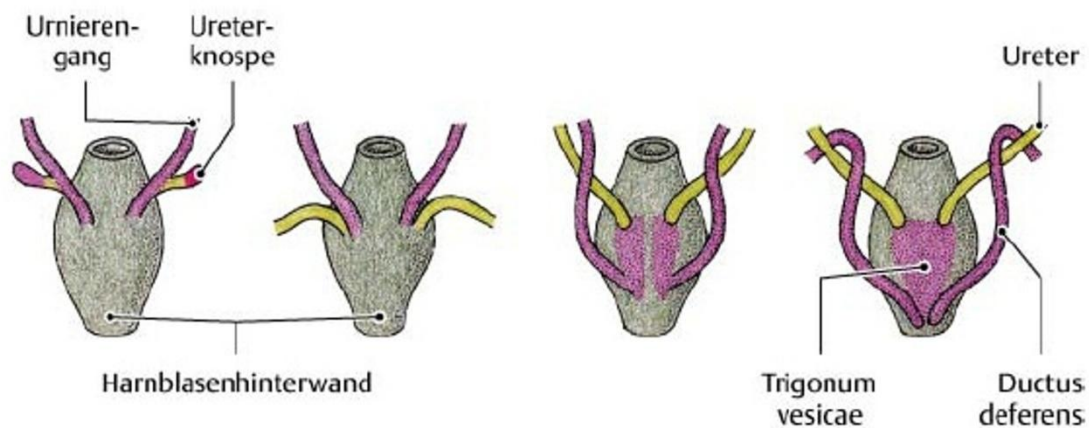


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Insertion der Ureteren und der Bildung des Trigonum vesicae in der Embryonalentwicklung (Quelle: [1])

1.1.3 Physiologie und Urodynamik

Harnspeicherung und Harnentleerung unterliegen einem komplexen Zusammenspiel aus willkürlicher Kontrolle und Reflexen. Der normale Innendruck der Blase bei Füllvolumen unter 500ml beträgt in der Regel nicht mehr als 15 cmH₂O und ändert sich aufgrund der hohen Dehnbarkeit der Blasenwand in diesem Volumenbereich auch kaum. Die Dehnung der Blase erfolgt zunächst nahezu wahrnehmungsfrei, da afferente Signale intraspinal unterdrückt werden. Ab einem Füllungsvolumen von ca. 150-250ml kommt es zu einem ersten leichten Harndrang, der ab 350-450ml als stark wahrgenommen wird. Über das pontine Miktionszentrum kann die Blasenentleerung willkürlich unterdrückt werden, bis die äußeren Umstände sie zulassen. Plötzliche intraabdominelle oder intravesikale Druckanstiege werden über eine reflektorische Zunahme des Sphinktertonus kompensiert. Die Blasenentleerung kann willkürlich über eine Reduktion des Tonus der Sphinkter- und Beckenbodenmuskulatur eingeleitet werden. Im Zuge dessen kommt es automatisch zu einer Kontraktion des M.

Detrusor, wodurch der intravesikale Druck den Harnröhrenverschlußdruck übersteigt und die Harnentleerung beginnt. Der Detrusorkontraktionsdruck liegt bei ungestörten Abflußverhältnissen bei maximal 40 cmH₂O (Frau) bzw. 50 cmH₂O (Mann). Am Ende der Miktion kontrahiert sich die Sphinkter- und Beckenbodenmuskulatur wieder, wodurch die Detrusorkontraktion endet. Das Zusammenwirken der vielen verschiedenen Abläufe kann in vielfältiger Weise gestört werden. [2, 9-11]

1.2 Die infravesikale Obstruktion

Liegt ein distal der Harnblase gelegenes Abflusshindernis vor, kommt es infolge dessen zu einem dauerhaft erhöhten Druck innerhalb derselbigen. Die häufigste Ursache hierfür im Erwachsenenalter ist die benigne Prostatahyperplasie beim Mann, im Kindesalter sind angeborene Anomalien der infravesikalen Harnwege häufiger. Die höchste Inzidenz (1:8000-12.500) haben hier die posterioren Urethralklappen. Es handelt sich hierbei um eine intraurethrale gefensterter Membran, die ein erhebliches Hindernis für den Urinabfluß darstellt. Bezüglich der embryologischen Pathogenese gibt es verschiedene Theorien, von denen sich bis heute keine eindeutig etablieren konnte. [12].

Etwa siebenmal weniger häufig sind anteriore Urethralklappen, die ein völlig anderes anatomisches Korrelat aufweisen, als die posterioren Klappen. Sie treten fast immer in Form eines im distalen Abschnitt der Harnröhre ventral gelegenes Divertikel auf, welches eine ähnlich hinderliche Wirkung auf den Harnabfluß ausübt, wie die posterioren Urethralklappen. Ob es sich hierbei um eine inkomplette Harnröhrenduplikatur handelt, oder eine andere embryologische Pathogenese zugrunde liegt, ist umstritten. [13]

Andere Ursachen für eine angeborene infravesikale Obstruktion sind die sogenannte „Valve de Guérin“, eine klappenartige Struktur mit Sinus, dorsal im distalen Harnröhrenabschnitt gelegen, sowie der „Cobb's collar“, ein Überrest des Sinus urogenitalis, und die Cowper'sche Syringozele. [13]

Ebenfalls mögliche Ursachen einer Harnabflußbehinderung sind kongenitale Harnröhrenstenosen, die in der Regel iatrogen, durch Traumata oder Entzündungen entstehen.

Die angeborene Harnröhrenatresie ist extrem selten und mit dem Leben nur theoretisch bei gleichzeitig bestehender Urachusfistel vereinbar. Generell läßt sich im übrigen festhalten, daß die infravesikale Obstruktion in ihren sämtlichen Erscheinungsformen fast ausschließlich männliche Individuen betrifft und beim weiblichen Geschlecht zwar in Einzelfällen beschrieben ist [14], aber eine ausgesprochene Rarität darstellt.

Bei über längere Zeit bestehendem erhöhtem Blaseninnendruck (über 40 cmH₂O) kommt es zu morphologischen Veränderungen der Blasenwand, es bildet sich die sogenannte „Balkenblase“ oder auch „Trabekelblase“. Ein wesentlicher Bestandteil der

Blasenwandveränderungen ist hierbei eine Größenzunahme der muskulären Schicht, die sowohl eine Hypertrophie als auch eine Hyperplasie des Gewebes einschließt [15], wobei die klinischen Erfahrungen in der Zystoskopie gezeigt haben, daß im Gegensatz zu den kranial gelegenen Anteilen der Blasenboden im Bereich des Trigonum vesicae kaum betroffen ist.

Außerdem führt das vermehrte Wachstum von Bindegewebe zu einer verminderten Dehnbarkeit und Elastizität der Blase [16], so daß die Blasenfunktion insgesamt stark beeinträchtigt wird. Die Balkenblase ist des weiteren mit einem erhöhten Risiko für Folgeerkrankungen behaftet, wie z.B. Harnblasendivertikel oder Harnwegsinfekte. Neuere Arbeiten legen außerdem den Schluß nahe, daß die Karzinomentstehung unter Karzinogenexposition bei der chronischem Überdruck ausgesetzten Harnblase beschleunigt ist [17].

1.3 Zytokine und Intrazelluläre Signalwege

Zytokine sind Polypeptide mit einer Molekülmasse von 15-25 kDa, die von den meisten Körperzellen exprimiert und sezerniert werden können und die über Rezeptoren und die Aktivierung von Signalkaskaden Stoffwechsel, Genexpression, Differenzierung, Proliferation und Apoptose an der Zielzelle beeinflussen können. Zytokine werden als Reaktion auf bestimmte Noxen, wie z.B. mechanische Reize, Verletzungen oder Infektionen freigesetzt. Sie können rasch produziert und sezerniert werden und wirken im pico- bis nanomolaren Bereich. Im Gegensatz zu endokrinen Substanzen, wie z.B. Insulin, die über größere Entfernungen Zielgewebe beeinflussen können, ist die Wirkung von Zytokinen regional begrenzt. Sie wirken entweder autokrin oder parakrin. Dabei können sowohl zwei unterschiedliche Zytokine über Aktivierung derselben Signalkaskade die gleiche Wirkung haben, als auch dasselbe Zytokin an zwei unterschiedlichen Geweben eine verschiedene Wirkung entfalten. Die übergeordnete Gruppe der Zytokine läßt sich in vier Untergruppen unterteilen: Wachstumsfaktoren, Interleukine, Interferone und Chemokine. Für die vorliegende Arbeit von besonderem Belang sind die Wachstumsfaktoren. Sie beeinflussen die Differenzierung und Proliferation bestimmter Gewebe. Durch extrazelluläre Bindung der Ligandenproteine an die korrespondierenden Rezeptoren werden auf der zytoplasmatischen Seite Signalkaskaden aktiviert, d.h. es werden nacheinander verschiedene Signalproteine aktiviert, meist durch Phosphorylierung oder Austausch von GDP durch GTP. Am Ende der Kaskade steht eine Modifikation der Expression entsprechender Zielgene. Allen Wachstumsfaktoren gemein ist eine Aktivierung der Ras/Raf/MAPK-Kaskade.

Sie binden insgesamt an drei verschiedene Rezeptortypen: Rezeptor-Tyrosin-(Serin/Threonin)Kinasen, Rezeptoren mit assoziierten Kinasen und G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Ob und in welchem Maße ein Zelltyp auf einen bestimmten Wachstumsfaktor reagiert, hängt davon ab, ob der entsprechende Rezeptor dort exprimiert wird und an der Zelloberfläche vorhanden ist. [18, 19]

1.4 Der Platelet-derived-growth-factor (PDGF)

1.4.1 Allgemeines

Der Platelet-derived-growth-factor – kurz: PDGF – ist ein Wachstumsfaktor, der aus zwei Untereinheiten besteht und als Hetero- oder Homodimer vorkommt. Zum ersten mal als solcher identifiziert wurde er vor über 35 Jahren [20, 21] und ist seither Gegenstand intensiver Forschung gewesen. Es sind bislang vier verschiedene Typen von Untereinheiten beschrieben: PDGF-A,B,C und D, wobei die erst kürzlich nachgewiesenen C- und D-Untereinheiten im Gegensatz zu den A- und B-Untereinheiten Proteolytisch aus Vorläuferformen entstehen und nach bisherigem Kenntnisstand keine Heterodimere bilden.

Der PDGF-Rezeptor – kurz: PDGFR – liegt in der aktivierten Form ebenfalls als Dimer zweier Rezeptorproteinuntereinheiten vor. Hier sind eine α - und eine β -Untereinheit beschrieben, die ebenfalls Hetero- oder Homodimere bilden können. Die unterschiedlichen Ligandendimere binden an verschiedene Rezeptordimere:

Rezeptor	α/α	α/β	β/β
Liganden	AA, AB, BB, CC	AB, BB, CC	BB, DD

Beim PDGFR handelt es sich um einen Rezeptor vom Rezeptor-Tyrosinkinase-Typ. Er besteht aus einer extrazellulären Ligandenbindungsstelle, einer Transmembrankomponente und einem zytoplasmatischen Anteil. Bei Ligandenbindung dimerisiert der Rezeptor und aktiviert die zytoplasmatisch gelegene Kinase, was zu einer Autophosphorylierung von Tyrosinresten führt. Die entstehenden Phosphotyrosinreste dienen als Interaktionsstelle mit intrazellulären Signalmolekülen, wobei es sich sowohl um reine Adapterproteine, als auch um Enzyme oder Transkriptionsfaktoren handeln kann. Über eine Aktivierung des PDGF-Rezeptors werden im wesentlichen vier verschiedene Signalkaskaden aktiviert: die Ras/Raf/MAPK-Kaskade, der Jak/Stat-Signalweg, die PI_3K -Kaskade und die PLC- γ -Kaskade. [19] Der PDGF und sein Rezeptor spielen sowohl eine Rolle bei der Proliferation, als auch bei der Migration bestimmter Zielzellen. [22] Auch in der Embryonalentwicklung haben sie eine große Bedeutung. Die fehlende Expression einer der Untereinheiten von Ligand oder

Rezeptor sind mit dem Leben nicht vereinbar. Untersuchungen an knock-out-Mäusen zeigten eine große Bandbreite an Fehlbildungen in vielen vital bedeutenden Bereichen. [23]

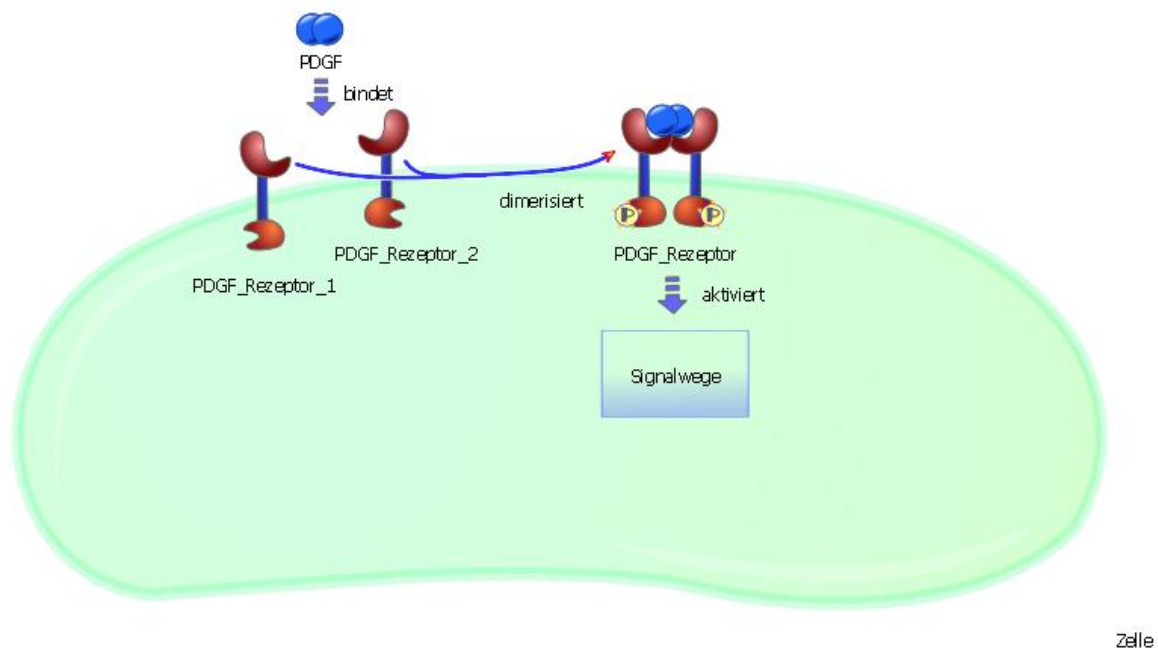


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Ligandenbindung, Dimerisierung und Autophosphorylierung des PDGF-Rezeptors

1.4.2 Klinische Bedeutung des PDGF

Dem PDGF wird eine Mitbeteiligung oder kausale Rolle in der Pathogenese verschiedener Krankheiten, insbesondere bestimmter Krebsarten, zugeschrieben und PDGF-Inhibitoren werden gegenwärtig als möglicher Ansatz bei der Behandlung mehrerer Krankheiten erforscht und erprobt. Die klinische Bedeutung des PDGF konzentriert sich im wesentlichen auf drei Untergruppen: Tumoren, Gefäßerkrankungen und Fibrosen. Hierbei stehen zwei Zelltypen besonders im Fokus, da ihnen eine starke Reaktion auf PDGF-Stimulation zugeschrieben wird: Fibroblasten und glatte Muskelzellen. [24]

Der PDGF scheint tumorbiologisch an drei der wesentlichen Prozesse in Genese und Progression von Krebserkrankungen beteiligt zu sein: selbsterhaltendes Wachstum, Angiogenese und Metastasierung.

Als Beispiel seien hier die Glioblastome angeführt. Über diese Gruppe wurde diesbezüglich bereits eine Reihe von Arbeiten veröffentlicht, in denen gezeigt werden konnte, daß sämtliche bekannten Liganden- und Rezeptoreinheiten von Glioblastomzellen exprimiert werden. [25, 26] Ebenso demonstrierten weitere Arbeiten, daß Gliagewebe bei Überexpression von PDGF/R zur Bildung gliomartiger Tumore neigt [27] und daß die Wachstumsgeschwindigkeit solcher Tumorzellen in vitro durch PDGF-Inhibitoren reduziert werden kann. [28] Es wird vermutet, daß auto- und parakrine Sekretionsschleifen des PDGF pathogenetisch von Bedeutung sind. PDGF-Inhibitoren befinden sich in der Chemotherapie des Glioblastoms derzeit in klinischer Erprobung, z.B. Imatinib, welches bereits zur Behandlung anderer maligner Erkrankungen Eingang in die klinische Praxis gefunden hat. [24, 29]

Auch in der Arteriosklerose scheint der PDGF in die Pathophysiologie involviert zu sein, so läßt sich in arteriosklerotisch veränderten Gefäßwänden stets eine erhöhte Expression der PDGF-Untereinheiten A-D nachweisen, in glatter Muskulatur zeigt sich hierbei eine Überexpression beider PDGFRs [30]. Bei der pulmonalen Hypertonie und in vaskulären Retinopathien wird dem PDGF ebenfalls eine Rolle zugeschrieben, wobei insbesondere die glatte Muskulatur der Gefäßwände betroffen zu sein scheint [24].

Zuletzt konnte auch bei fibrotischen Umbauprozessen, wie z.B. Lungen- und Leberfibrose in den jeweiligen Geweben eine erhöhte Expression von PDGF nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit der Beobachtung, daß außer glatten Muskelzellen auch Fibroblasten in vitro mit einer deutlichen Proliferationssteigerung auf Stimulation mit PDGF reagieren. [24]

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß der gegenwärtige Stand der Forschung über die klinische Bedeutung des PDGF den Schluß zuläßt, daß bei bestimmten Krankheitsbildern über auto- oder parakrine Sekretionsschleifen von PDGF eine abnorme Gewebsproliferation und -migration ausgelöst oder unterhalten wird und hierbei insbesondere glatte Muskelzellen und Fibroblasten betroffen sind.

1.5 Andere Wachstumsfaktoren und weitere Zielgene

Neben dem PDGF existieren noch viele weitere Gene, bzw. von solchen codierte Proteine, die die Zellproliferation unter bestimmten Voraussetzungen beeinflussen können und insofern für die Belange dieser Arbeit von Interesse sind. An erster Stelle zu nennen sind hier weitere Vertreter aus der Familie der Wachstumsfaktoren. Eng verwandt mit dem PDGF ist der Vascular-Endothelial Growth factor (VEGF), da sie in Teilen dieselbe Aminosäuresequenz aufweisen. Sein Rezeptor ist der VEGFR, sowohl von Ligand, als auch vom Rezeptor existieren mehrere Unterformen. Der VEGF wird vorwiegend bei Hypoxie ausgeschüttet und induziert durch seine Wirkung an der Zielzelle Angiogenese. [31]

Ein weiterer, in seinen Eigenschaften sehr gut erforschter Wachstumsfaktor ist der Epidermal growth factor (EGF) und sein korrespondierender Rezeptor EGFR, der auch unter der Bezeichnung Human-epidermal-growth-factor-receptor (HER1-4) firmiert. Der EGF aktiviert den PI3K, den Jak/STAT und den Ras/Raf-Signalweg und wirkt auf diese Weise an der Zielzelle proliferationsstimulierend und apoptoseverhindernd. Er ist ein wichtiger Angriffspunkt für moderne Krebstherapie und EGF-antagonisierende Medikamente haben bereits Eingang in die klinische Anwendung gefunden. [32] Der EGF-Rezeptor kann außer durch den EGF auch durch andere Liganden aktiviert werden, so z.B. durch den Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF). Beide Faktoren, EGF und HB-EGF, werden zunächst als membranständige Proteine synthetisiert und dann proteolytisch in eine lösliche Form umgewandelt. Die lösliche Form ist der letztendliche Ligand des Rezeptors, doch auch für die membranständigen Vorläufermoleküle werden verschiedene Funktionen diskutiert. [33] So auch beim Transforming growth factor α (TGFA), der ebenfalls als membranassoziiertes Molekül vorkommt und ebenfalls den EGFR aktivieren kann. Für ihn ist bei der verankerten Form eine sogenannte „juxtakrine Stimulation“ über Zell-Zell-Kontakt nachgewiesen. [33] Zu einer anderen Gruppe von Wachstumsfaktoren gehört der Insulin-like-growth-factor (IGF) und sein Rezeptor (IGFR). Es existieren jeweils 2 Unterformen (IGF1/2 bzw. IGFR1/2). Darüber hinaus gibt es 6 regulierende Proteine, die IGF-binding-proteins (IGFBP1-6) und Proteasen, die wiederum diese Proteine beeinflussen. Fast jeder Zelltyp im menschlichen Körper lässt sich durch IGF stimulieren, der Rezeptor aktiviert den Ras/Raf- und den PI3K-Signalweg. In der klinischen Forschung hat sich der IGFR in den letzten Jahren als mögliches Ziel in der Krebstherapie etabliert. [34]

Ein in seiner Rolle bezüglich Zellproliferation und Pathogenese verschiedener Krankheiten noch nicht vollständig verstandener Wachstumsfaktor ist der Hepatocyte growth factor (HGF, auch scatter factor genannt). Er aktiviert unter anderem auch die Ras/Raf- und die PI3K-Kaskade und stellt ebenfalls einen Ansatzpunkt in der neueren Tumorforschung dar, jedoch ist seine Wirkung auf verschiedene Zelltypen wesentlich vielfältiger als bei anderen Wachstumsfaktoren. So ist für ihn eine proliferationsfördernde Wirkung für Epithelzellen der Niere beschrieben, jedoch eine apoptoseinduzierende Wirkung an Epithelzellen der Ovarien. [35] An Blasenkrebszellen konnte für ihn eine invasions- und migrationsfördernde Wirkung beschrieben werden [36].

Die größte hier behandelte Gruppe von Wachstumsfaktoren sind die fibroblast growth factors (FGF). Im menschlichen Organismus sind 22 verschiedene FGFs beschrieben, wovon FGF1-10 an fibroblast growth factor receptors (FGFR) binden. FGF11-14 weisen zwar deutliche strukturelle Ähnlichkeiten zu den anderen FGFs auf, binden jedoch an andere Rezeptoren und erfüllen unterschiedliche Funktionen. FGF16-23 sind bis jetzt noch nicht vollständig charakterisiert. FGF15 existiert im Menschen nicht. Die FGF-Familie wird sowohl in embryonalem als auch in adultem Gewebe exprimiert und ist an der Embryonalentwicklung, z.B. der Extremitäten und des Nervensystem beteiligt, sowie beim Erwachsenen an Wundheilung und Geweberegeneration. [37]

Außer Wachstumsfaktoren seien hier noch weitere Proteine erwähnt, die im Folgenden von Bedeutung sein werden: der leukemia inhibitory factor (LIF) und zwei Vertreter der sogenannten CCN-Proteine – Cyr61 (cysteine-rich, angiogenic inducer, 61) und CTGF (Connective tissue growth factor).

LIF ist ein in nahezu allen Geweben vorkommendes Zytokin aus der Gruppe der Interleukine mit einer großen Anzahl verschiedener Funktionen im Organismus, u.a. als Regulator der Hämatopoese, der ACTH-Sekretion und auch der Proliferation verschiedener Zelltypen. Hervorzuheben ist hier seine stimulierende Eigenschaft auf Muskel-Satellitenzellen und auf Herzmuskelzellen. Seit eine biotechnologische Herstellung möglich ist, findet er darüber hinaus breite Anwendung in der Stammzellforschung aufgrund seiner Eigenschaft, die Totipotenz embryonaler Stammzellen zu erhalten. [38]

Die CCN-Familie beinhaltet eine Reihe von Genen, die sich in den letzten Jahren im Gegensatz zu ihrer früheren Einordnung in die Nähe der Wachstumsfaktoren als

eigenständige Gruppe etabliert hat. Zwei von ihnen sollen hier kurz beleuchtet werden. Der CTGF wird vorwiegend in Fibroblasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen von Gefäßen und Epithelzellen exprimiert und besitzt mitogenes Potential für verschiedene Zelltypen. Hierbei scheint er aber nicht als eigenständiger Wachstumsfaktor, sondern als Mediator anderer Signalgeber zu fungieren. Der synergistische Effekt mit Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF, EGF) auf die Zellproliferation deutet darauf hin, daß er andere Signalwege aktiviert als diese. [39]

Cyr61 kommt in variierender Stärke der Präsenz in vielen adulten menschlichen Geweben vor. Das Protein gilt als Mediator mitogener Substanzen, wie PDGF, EGF und FGF. Es besitzt selbst kein mitogenes Potential, verstärkt aber die Wirkung o.g. Faktoren. Abhängig vom jeweiligen Zelltyp kann die Expression des Cyr61-Gens von Wachstumsfaktoren z.T. schnell und beträchtlich gesteigert werden. [39]

1.6 Reaktionen glatter Muskulatur auf mechanischen Streß

Die Abläufe auf zellulärer Ebene, die sich innerhalb glatter Muskulatur bei mechanischer, insbesondere Druck- und Dehnungsbelastung, abspielen und für eine Entstehung von Hyperplasie und Hypertrophie bedeutsam sind, sind seit längerer Zeit von besonderem wissenschaftlichem Interesse. Im Zentrum der Forschung standen hier bisher vor allem die glatten Muskelzellen von arteriellen Gefäßwänden unter Belastung mit Drücken, die im physiologischen Bereich des arteriellen Gefäßsystems liegen. Im Hinblick auf den Gegenstand der vorliegenden Arbeit sei im Folgenden jedoch ein Schwerpunkt auf Erkenntnisse im Hinblick auf glatte Muskulatur der Blasenwand gelegt. Desweiteren wird die Rolle des PDGF und PDGF-abhängiger Signalwege bei der Reaktion glatter Muskulatur auf mechanische Kräfte an dieser Stelle ausgeklammert, da sie aufgrund ihres zentralen Charakters für diese Arbeit detailliert im folgenden Abschnitt besprochen wird.

Wie bereits dargelegt wurde, werden durch chronische Druckbelastung der Harnblase Umbauprozesse induziert, die zu pathologischer Proliferation von Bindegewebe und Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskulatur führen. Bereits vor einiger Zeit konnte gezeigt werden, daß durch Druckbelastung die Bildung von Typ III-Kollagen und Fibronectin durch glatte Muskelzellen verstärkt wird und somit mechanische Reize einen direkten Einfluß auf Bildung extrazellulärer Matrixproteine haben. [16] Ebenso gilt seit längerem als gesichert, daß erhöhte bzw. erniedrigte Expression bestimmter Gene bei den auf eine infravesikale Obstruktion folgenden Umbauprozessen eine Schlüsselrolle spielt. [40, 41] Auch bei nur kurzfristiger Überdehnung der Blase von Tagen bis Wochen konnte am Rattenmodell sowie am Meerschweinchen ein direkter Anstieg der DNA-Synthese in glatten Muskelzellen der Blasenwand nachgewiesen werden. [42, 43] Andere Untersuchungen zeigten, daß die durch mechanische Reize provozierte Reaktion vom Ausmaß der einwirkenden Kräfte abhängt. So zeigte sich bei leichter Dehnung glatter Blasenmuskelzellen *in vitro* vordergründig eine erhöhte Proteinsynthese, bei stärkerer Dehnung ausschließlich eine vermehrte DNA-Synthese. [44] In einer weiteren *in-vitro*-Studie wirkte ein hydrostatischer Druck von 100mmHg proliferationsfördernd, ein Druck von 200mmHg hingegen apoptoseinduzierend auf glatte Muskelzellen der Blase. [45]

Da wie oben bereits dargelegt die Regulation der Expression bestimmter Gene für die zelluläre Antwort glatter Muskelzellen auf Druck- und Dehnungsreize von zentraler

Bedeutung ist, existiert bereits eine Reihe von Untersuchungen bezüglich Auf- und Abregulation der Genexpression. So konnte schon vor einiger Zeit der IGF1 als Kandidat für eine relevante Überexpression sowohl unter zyklischer als auch kontinuierlicher Druckbelastung identifiziert werden. [46, 47] Als gesichert gilt in der Literatur weiterhin eine bereits nach Stunden zyklischer Druckbelastung nachweisbare Überexpression des HB-EGF in glatten Muskelzellen. [48-50] Darüber hinaus zeigte sich in einer weiteren Untersuchung ein Anstieg der Expression des Gens des Entzündungsmediators Cyclooxygenase-2 (COX-2, auch: PTGS2) unter zyklischer Druckbelastung. [51] Ebenso konnte in verschiedenen Arbeiten ein Anstieg der Expression des LIF [50] und von Cyr61 und CTGF [52-54] bei mechanischen Reizen gezeigt werden. Über welche Rezeptoren und Signalwege eine Antwort auf Druckbelastung intrazellulär vermittelt wird, ist eine weitere Frage, die sich im Zusammenhang dieser Beobachtungen stellt und deren Beantwortung bereits zahlreiche Publikationen gewidmet sind. Es wird derzeit angenommen, daß mehrere Signalwege und Transkriptionsfaktoren für diese Mechanotransduktion verantwortlich sind. Gezeigt werden konnte eine mechanosensitive Aktivierung der JNK [55], eine Kinase aus der Familie der MAP-Kinasen, sowie eine erhöhte Aktivität der PKC [56, 57] und des PI3K-Signalwegs [58]. Als wichtigster hierdurch regulierter Transkriptionsfaktor gilt hierbei AP1. [41, 49] Bezüglich beteiligter Rezeptoren scheint, passend zur bekannten Überexpression von EGF und HB-EGF der EGFR eine wichtige Funktion zu haben. So konnte kürzlich nachgewiesen werden, daß eine Antagonisierung des EGFRs die stimulierende Wirkung mechanischer Reize an der glatten Muskelzelle abschwächen kann.[59] Außerdem wird dem PDGF und seinem Rezeptor eine Schlüsselrolle in der Mechanotransduktion glatter Muskelzellen zugesprochen. [41] Dies soll nun u.a. im folgenden Abschnitt besprochen werden.

1.7 Die Rolle des PDGF im Proliferationsverhalten glatter Muskelzellen

Daß der PDGF eine wichtige Rolle im Proliferationsverhalten und auch in der Reaktion auf mechanische Belastung in glatten Muskelzellen hat, ist weithin eine akzeptierte Tatsache. Auch pathogenetische Bedeutung bei Hyperplasie glatter Muskulatur, insbesondere als Reaktion auf Druckbelastung wird ihm beigemessen. [41] Noch nicht vollständig geklärt ist hierbei der genaue Mechanismus mittels dem der PDGF physikalische Reize in mitogene Signale umsetzt. An Zellkulturen aus glatten Gefäßmuskelzellen konnte in vitro durch Druck eine autokrine Sekretion hervorgerufen werden. [60] Desweiteren ließ sich in Gefäßmuskelzellen eine druckbedingte Überexpression des PDGFR- β beobachten. [61] In den im Zellverbund den Muskelzellen benachbarten Fibroblasten wurde in Kulturen aus Blasengewebe unter mechanischer Belastung ebenfalls eine Überexpression sowohl des PDGFB, als auch des PDGFR- β nachgewiesen [62], so daß auch parakrine Stimulationsmechanismen vermutet werden können, da eine Mitogenität für PDGF-BB an glatten Muskelzellen bestimmter Herkunft ebenfalls bereits gezeigt wurde. [63] Einen weiteren Anhalt für eine parakrine Sekretion liefert eine Untersuchung, in der eine PDGF-BB-Sekretion aus kultivierten bovinen arteriellen Endothelzellen mittels Dehnungsbelastung provoziert wurde. [64] Ebenso scheint eine rein mechanosensitive Komponente des PDGF-Rezeptors plausibel, da, wiederum an Kulturen aus Gefäßmuskelzellen, eine ligandenunabhängige Phosphorylierung des PDGFR- α allein durch zyklische Druckbelastung hervorgerufen werden konnte. [65] Ein weiterer Punkt ist die unterschiedliche Bedeutung der jeweiligen Untereinheiten von Ligand und Rezeptor für die PDGF-vermittelte zelluläre Reaktion. Der PDGF-AA, bzw. der PDGFR- α scheinen diesbezüglich eher für gesteigerte Proteinsynthese, der PDGF-BB bzw. PDGFR- β für vermehrte Zellproliferation verantwortlich zu sein. Daher wird vermutet, daß der PDGF sowohl an der Hyperplasie, als auch an der Hypertrophie glatter Muskulatur einen Anteil hat. [66]

Bezüglich der Signaltransduktion weisen die bisherigen Beobachtungen eine gewisse Schnittmenge zwischen PDGF-aktivierten und mechanisch aktivierten Signalwegen auf. Sowohl mechanische Belastung, als auch Stimulation mit PDGF aktivieren Kinasen der MAPK-Familie, die PI3K-Kaskade sowie die PKC-Kaskade in glatten Muskelzellen. [67, 68]

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zunächst in vitro mittels ELISA die mitogene Wirkung von PDGF-BB auf Zellkulturen humaner glatter Muskulatur der Harnblase zu untersuchen und somit zum einen die bisherigen Erkenntnisse von Stehr et al. [63] zu bestätigen und darüber hinaus in einem neuen Ansatz zwischen Detrusor- und Trigonumzellen zu differenzieren und so erste Anhaltspunkte für etwaige Unterschiede im Proliferationsverhalten beider Zelltypen zu gewinnen.

Im nächsten Schritt sollte mittels quantitativer Expressionsanalysen die unmittelbare Reaktion von glatten Blasenmuskelzellen auf mechanischen Streß erforscht werden. Zu diesem Zweck sollten in vitro kultivierte glatte Muskelzellen in einer speziellen Vorrichtung kontrolliert einem Überdruck ausgesetzt und die Genexpression verschiedener Zielgene quantitativ bestimmt werden. Anschließend sollte die Expression mit derjenigen von unbehandelten Kontrollkulturen verglichen werden. Die Mehrzahl der Autoren vorheriger Arbeiten aus diesem Gebiet arbeiteten mit relativ hochfrequentem zyklischen Wechsel von Druck und Relaxation, was den tatsächlichen hydrostatischen Verhältnissen innerhalb der Blase nur leidlich nahekommt. Daher erschien es sinnvoll, dieses Experiment mit kontinuierlichem Druck ohne Entspannungsphasen durchzuführen. Der hier zur Anwendungen gekommene Druck von etwa 100 mmHg, (entspricht ca. 125 cmH₂O) liegt deutlich in einem Bereich, der in vivo als pathologisch angesehen wird, ist aber nicht so hoch, daß davon ausgegangen werden müsste, daß er auf die Muskelzellen unmittelbar apoptoseinduzierend wirkt [45]. Die Zeitspanne der Druckbelastung wurde mit 1 Stunde so gewählt, daß möglichst kurzfristige und direkte Änderungen in der Genexpression erfaßt werden können.

Das Hauptaugenmerk der Expressionsanalysen sollte auf dem PDGF bzw. dem PDGF-Rezeptor liegen, um Hinweise darauf zu finden, ob die Muskelzellen unter Druckbehandlung sensibler für PDGF werden und/oder den Wachstumsfaktor selbst autokrin verstärkt sezernieren.

Darüber hinaus wurden noch weitere Wachstumsfaktoren mit korrespondierenden Rezeptoren in die Analyse mit einbezogen, die nach Sichtung der bisherigen Literatur von Interesse schienen.

Abschließend sollten wiederum die jeweiligen Daten getrennt in Detrusor und Trigonum verglichen werden, um etwaige Unterschiede im Proliferationsverhalten herauszuarbeiten, die aufgrund der verschiedenen embryologischen Herkunft und des unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbildes nicht unwahrscheinlich wären.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Lösungen, Medien, Zusätze

Name	Hersteller
Zellkultur, Immunhistologie+BrdU-Assay	
Phosphate buffered saline (PBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Glutamax RPMI 1640 Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fetal calf serum (FCS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-AldrichChemieGmbH, Steinheim
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
PDGF-BB recombinant, Mouse	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-AldrichChemieGmbH, Steinheim
anti-muscle-actin (mouse)-AK	DakoCytomation GmbH, Hamburg
Glycergel [®] Mounting Medium	DakoCytomation GmbH, Hamburg
mRNA-Isolation, cDNA-Synthese+realtime-PCR	
TRI Reagent [®] RNA Isolation Reagent	Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA
UltraPure [™] DNase/RNase-Free Distilled Water	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Random Hexamere	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
dNTPs (100 mM)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
SuperScript [®] II Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ribonuclease H (RNase H)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
iTaq SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

3.1.2 Kulturmedien

Kulturmedium:	Glutamax RPMI 1640 + 10% fetal calf serum + 1% Penicillin/Streptomycin
Low-serum-Medium:	Glutamax RPMI 1640 + 0,5% fetal calf serum + 1% Penicillin/Streptomycin
Serumfreies Medium:	Glutamax RPMI 1640 + 1% Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium:	5 Teile fetal calf serum, 4 Teile DMEM, 1,25 Teile DMSO

3.1.3 Kits

Beide aufgeführten Systeme wurden entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Etwaige Änderungen im Protokoll sind in den jeweiligen Kapiteln im Methodenteil angegeben.

Cell Proliferation ELISA, BrdU
(chemiluminescent)

Roche Diagnostics GmbH, Penzberg

Detection Kit Immunfluoreszenz

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.1.4 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Nalgene [®] Kryoröhrchen	Schubert & Weiss GmbH, München
Costar [®] Stripette [®] Serologiepipetten	Corning GmbH, Wiesbaden
Zellkulturflaschen	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Biosphere [®] Filterspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Falcon [™] 14(50) ml Tubes	BD, Heidelberg NUNC Röhrchen
Zellschaber	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Chamber slides	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
BioFlex 6-well Plates - Collagen Typ I/IV	Dunn Labortechnik, Asbach

Standard 96 Well PCR Plates
 LumiNunc™ Microwell Plates
 Multidishes Nunclon™
 Safe-Lock Reaktionsgefäße

PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
 Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
 Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
 Eppendorf AG, Hamburg

3.1.5 Geräte:

Gerät

Hersteller

BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Biofuge fresco	Heraeus GmbH, Hanau
Biofuge pico	Heraeus GmbH, Hanau
Centrifuge 5702	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge LMC-3000	Kisker-Biotech, Steinfurt
CO ₂ -Inkubator MCO-20AIC	Sanyo, Tokio, Japan
FlexCell® Strain Unit	Dunn Labortechnik, Asbach
Fluoview FV1000 Confocal Mikroskop	Olympus Europa GmbH, Hamburg
GENios Microplate Reader	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Pipette Accu-Jet	Brand GmbH + CO KG, Wertheim
Sicherheitswerkbank HeraSafe	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

3.1.6 Synthetische Oligonukleotide

Alle Primer wurden durch den Autor mit Primer Express 2.0 entworfen und von Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen. Die Primer wurden in ddH₂O zu 100 µM gelöst.

Symbol	forward primer (5'-3')	reverse primer (5'-3')
CTGF	GGTGTGTGACGAGCCCAAG	CATAGTTGGGTCTGGGCCAA
CYR61	CGAGGTGGAGTTGACGAGAAA	GCGAGGCTCCATTCCAAAA
EGF	TTTGCTCCTGTGATTATGATGGA	CGGTCACCAAAAAGGGACATT
EGFR	AACTGTTTGGGACCTCCGGT	AAGGCATGGCAGACCTGG
FGF1	GGGCCACTTCCTGAGGATC	TTCCGCACTGAGCTGCAG
FGF12	CAGATGCACCCAGATGGTACC	CTACACGCAGGCCACG
FGF6	TCTCGCGCCGGGCTA	TGCAGTAGAGCCTCCGCTG
FGF7	CTGAGGATCGATAAAAGAGGCAA	TTCCAAGTCCACTGTCCTG
FGFR1	AGCACATCGAGGTGAATGGG	TTGTCGGTGGTATTAAGTCCAGC
FGFR3	GGGCATGGAGTACTTGGCCT	GATCTTCATCACGTTGTCCTCG
HBEGF	GAGAATGCAAATATGTGAAGGAGCT	GGGAGGCTCAGCCCATG
HGF	TCACGAGCATGACATGACTCC	CCAGGGTGATTGAGACCCAT
IGF1	TGGTGGATGCTCTTCAGTTCG	TGAGGCGCCCTCCGA
IGF1R	CGATGTGTGAGAAGACCACCA	CCACACGTGCTTGGGCA
LIF	CTGAGGTTTCCTCCAAGGCC	TCCAGTGCAGAACCAACAGC
NGFB	CAGCTTTCTATCCTGGCCACA	CGCCTGTATGCCGATCAGA
NGFR	CATCCTGGCTGCTGTGGTT	GCTGTTGGCTCCTTGCTTGT
PDGFB	TGCTGCAACAACCGCAAC	GCTTCTTCCGCACAATCTCG
PDGFRA	TGGATTGAACCCTGCTGATG	ATCAGCCTGCTTCATGTCCAT
PDGFRB	CACAATGACTCCCGTGGACTG	CATCATTAGGGAGGAAGCCCA
TGFA	TTCCCACACTCAGTTCTGCTTC	ACCAACGTACCCAGAATGGC

VEGFA	GTGTACGTTGGTGCCCGC	ACAAATGCTTTCTCCGCTCTG
FGF6	CCCTCTTCGTTGCCATGAAC	TTGGGCAGGAGGGTTTCTC
FLT1	AAGCAGGCAAATGTGTTCAAAA	CCGGGAATGATGATACAGCC
ACVR2B	AAGAAGGGCTGCTGGCTAGAT	AGCAGCAGAAGTACACCTGGG
KDR	TGACTTGGCCTCGGTCATTT	AATGTACACGACTCCATGTTGGTC
TBP	GCCCGAAACGCCGAATAT	CCGTGGTTTCGTGGCTCTCT

3.1.7 Software

Name	Hersteller
Primer Express 2.0	Applied Biosystems
Microsoft Office 2007	Microsoft
Open Office 3.1.1	Freeware
Tinker Cell 1.0.0	Freeware
EndNote X2	Thomson Reuters

3.1.8 Datenbanken und Recherche

Cochrane Library	The Cochrane Collaboration, Freiburg
GeneCards® V3	Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
MEDLINE	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA
PubMed	U.S. National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Probengewinnung

Die Gewinnung von Muskelgewebeproben aus M. Detrusor (D) und Trigonum vesicae (T) erfolgte im Rahmen von Ureterreimplantationen am Dr-von-Haunerschen-Kinderspital der LMU München bei Patienten im Kindesalter. Die Weiterverarbeitung erfolgte unmittelbar nach der Probeentnahme. Die Entnahme erfolgte im Sinne eines *informed consent*, auf der Grundlage des Ethikvotums Nr. 056-11 der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät, welches in Kopie der vorliegenden Arbeit beigelegt ist.

3.2.1.2 Zellkultur

Die Gewebestücke wurden nach sterilem Transport unter dem Abzug in PBS gewaschen, mit einem Skalpell zerteilt und je nach Probengröße in 1-2 15ml-Zellkulturflaschen verteilt. Nach Zugabe von 0,5-1ml Kulturmedium wurde der Ansatz inkubiert. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle 2-3 Tage. Die Gewebestücke wurden nach spätestens einer Woche entfernt. Ab diesem Zeitpunkt wurden 5ml Kulturmedium pro Flasche zu den Kulturen gegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte weiterhin alle 2-3 Tage. Eine Begutachtung und Kontrolle der Zellkulturen erfolgte regelmäßig unter dem Lichtmikroskop. Bei ausreichendem Zellwachstum wurden die Kulturen im Verhältnis 1:2 gesplittet (siehe Abschnitt 3.2.1.3). Sobald dies möglich war, wurden Zellen aus einer frühen Passage als Reserve eingefroren (siehe Abschnitt 3.2.1.5).

Sofern nicht anders angegeben wurden Zellkulturen stets bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.2.1.3 Trypsinieren/Splitten

Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen in 3ml PBS pro Flasche gewaschen. Danach wurde pro Flasche 1ml Trypsin-EDTA-Lösung dazugegeben und für 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden 4ml Kulturmedium hinzugegeben, die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und samt Medium in ein 14ml-Falcon-Röhrchen übertragen. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 1000rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in der für die gewünschte Weiterverarbeitung erforderlichen Menge Kulturmedium resuspendiert. Für das Splitten im Verhältnis 1:2 wurden die Zellen in 10ml Kulturmedium gelöst, die anschließend zu gleichen Teilen auf 2 neue 15ml-Zellkulturflaschen verteilt wurden.

3.2.1.4 Zellen zählen

Die Zellen wurden wie vorher beschrieben trypsinisiert und das nach dem zentrifugieren gewonnene Pellet in 1ml Kulturmedium gelöst. 10µl der gewonnenen Zellsuspension wurden in eine Zählkammer pipettiert, anschließend 1-3 Kleinquadrate unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und hieraus die Zellzahl/ml und ggf. das für die Weiterverarbeitung erforderliche anteilige Volumen der Zellsuspension berechnet.

3.2.1.5 Einfrieren von Zellen

Zunächst wurde die erforderliche Menge Einfriermedium bei 4°C aufgetaut und pro 15ml-Zellkulturflasche 5 Kryoröhrchen ebenfalls bei 4°C gekühlt. Die zum einfrieren bestimmten Zellkulturen wurden wie beschrieben trypsinisiert, das Pellet in 0,5ml DMEM gelöst und sofort 7ml Einfriermedium je Zellkultur dazugegeben und durchmischt. 1,5ml der entstandenen Lösung wurden in je ein Kryoröhrchen überführt, welche zügig bei -80°C eingefroren und nach 1-3 Tagen in den Kryoturm umgelagert wurden.

3.2.1.6 Auftauen von Zellen

Je aufzutauendem Kryoröhrchen wurde ein 14ml-Falcon-Röhrchen mit 9ml Kulturmedium befüllt und eine 15ml-Zellkulturflasche bereitgelegt. Die entsprechenden Kryoröhrchen wurden dem Kryoturm entnommen, zügig transportiert, aufgetaut und der Inhalt in die vorbereiteten 14ml-Falcon-Röhrchen überführt. Diese wurden für 5 Minuten bei 1000rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 5ml Kulturmedium resuspendiert und in die jeweilige 15ml-Zellkulturflasche überführt. Der erste Wechsel des Mediums erfolgte am nächsten Tag.

3.2.2 Immunfluoreszenzfärbung

Zum Nachweis, daß es sich bei den gewonnenen Zellkulturen um Muskelzellen handelte, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung des Markerantigens muscle-actin mit fixierten Zellen durchgeführt.

Die entsprechende Zellkultur wurde wie beschrieben trypsiniert und ca. 10.000 Zellen pro Kammer in chamber slides ausgesät. Nachdem die Zellen angewachsen waren, wurden sie für 15 Minuten in Paraformaldehyd fixiert und anschließend luftgetrocknet. Die fixierten Zellen wurden vor jedem der folgenden Arbeitsschritte bis zur Gegenfärbung dreimal für 5 Minuten in Tris-Puffer gewaschen.

Zunächst wurde der Ansatz für 10 Minuten mit blocking reagent blockiert und anschließend der Primärantikörper muscle actin in der Verdünnung 1:25 bei 4°C einschließlich Negativkontrolle über Nacht inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluß die Chromogen-Substrat-Lösung zweimal für 3 Minuten dazugegeben. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalanlösung für 2 Minuten. Danach wurden die chamberslides mit Wasser gespült, getrocknet und nach Entfernung der Kammern und Kontrolle unter dem Lichtmikroskop mit Glycergel eingedeckelt.

3.2.3 BrdU-Proliferationsassay

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens der gewonnenen Zellkulturen unter Behandlung mit Platelet-derived growth factor BB wurde ein Bromdesoxyuridin (BrdU)-gekoppelter ELISA durchgeführt. BrdU wird in proliferierenden Zellen bei der DNA-Synthese anstelle von Desoxythymidintriphosphat in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Über eine Messung der während eines definierten Beobachtungszeitraums erfolgten BrdU-Inkorporation kann so indirekt die Proliferationsaktivität einer Zellkultur bestimmt werden. Bei ausschließlicher Behandlung synchronisierter Zellen mit PDGF-BB in serumfreiem Medium kann diese Aktivität mit der Antwort auf PDGF-BB nahezu gleichgesetzt werden.

Von jeder zu untersuchenden Zellkultur wurden in eine schwarze 96-well-Platte mit durchsichtigem Boden 4 wells mit je 5000 Zellen in 100µl Kulturmedium ausgesät. Zusätzlich wurden als Hintergrundkontrolle 4 wells ausschließlich mit je 100 µl Kulturmedium befüllt. Mit der Hintergrundkontrolle wurde im folgenden – bis auf die Zugabe von PDGF-BB – ebenso verfahren, wie mit den übrigen wells. Der Ansatz wurde für 24h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte zur Synchronisierung der Zellen ein Wechsel des Nährmediums von normalem Kulturmedium zu low-serum-Medium für 48h. Anschließend wurde PDGF-BB in verschiedenen Konzentrationen in serumfreiem Medium hinzugegeben.

Nach 8h Inkubation wurde die gebrauchsfertige BrdU-Lösung dazupipettiert, so daß eine Endkonzentration von 10µM BrdU erreicht wurde. Nach weiteren 16h Inkubation wurde das Medium aus allen wells entfernt und die Zellen luftgetrocknet. Dann wurden pro well 200µl der gebrauchsfertigen FixDenat-Lösung auf die Zellen gegeben und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden 100 µl pro well der kurz vor der Verwendung vorbereitete Anti-BrdU-POD working solution nach Entfernung der FixDenat-Lösung zu den Zellen gegeben und für 90 Minuten, ebenfalls bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden alle wells abermals entleert und die Reste der Anti-BrdU-POD working solution durch dreimaliges waschen der wells für 0,5-5 Minuten mit 1:10 in aqua dest. verdünntem washing buffer entfernt.

Zur abschließenden Substratreaktion und Lumineszenzmessung wurde der Boden der 96-well-Platte zunächst mit einer nicht-durchsichtigen selbstklebenden Folie abgeklebt und 100 µl pro well der vorbereiteten 20°C warmen Substrat-Lösung zügig hinzupipettiert. Der Ansatz wurde

für 3 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Shaker inkubiert und dann in einem microplate-Luminometer die Lumineszenzmessung durchgeführt. Die Ergebnisse (rlu/s) wurden von einem angeschlossenen Computer aufgezeichnet.

3.2.4 Druckexperiment

Zur Untersuchung der Genexpressionsänderungen in glatten Muskelzellen unter Druckbedingungen mussten lebende Zellen unter Kulturbedingungen hydrostatischem Druck ausgesetzt werden. Zu diesem Zweck wurden pro Zellkultur etwa 100.000 Zellen pro well in mindestens zwei wells einer Bioflex Flexcell 6-well-Platte in je 2ml Kulturmedium ausgesät, nachdem sie wie beschrieben trypsinisiert worden waren. Danach wurden die Zellen bis zur annähernden Konfluenz wachsen gelassen und anschließend zur Synchronisation für 48h in low-serum-Medium inkubiert. Vor dem Druckexperiment wurde das low-serum-Medium gegen serumfreies Medium ausgetauscht. Da das für das Druckexperiment erforderliche Gerät sich nicht am Arbeitsplatz des Autors befand, war an dieser Stelle ein Transport von ca. 120 Minuten erforderlich. Hierzu wurden die 6-well-Platten nach Möglichkeit temperaturkonservierend gepolstert und verpackt. Nach Ankunft wurden die Kulturen zunächst etwa 60 Minuten bei 37°C inkubiert und dann an das Flexcellsystem [69] angeschlossen.

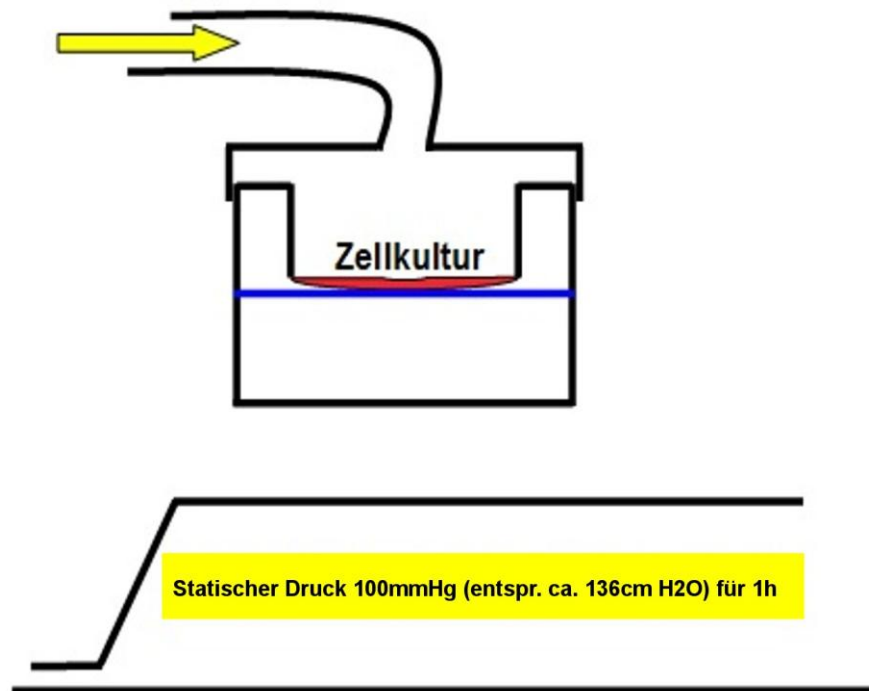


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Flexcellsystems: Die Zellkulturen wurden im Inkubator luftdicht an den von Computer und Steuerungseinheit kontrollierten Kompressor angeschlossen und für die vorgegebene Zeit dem gewünschten Druck ausgesetzt.

Die Zellkulturen wurden anschließend für 60 Minuten einem statischen Druck von 100mmHg ausgesetzt und gleichzeitig eine Kontrollkultur ebenfalls für 60 Minuten in serumfreiem Medium bei 37°C im Inkubator belassen. Danach erfolgte unmittelbar die Isolation von mRNA (siehe Abschnitt 3.2.5).

3.2.5 RNA-Isolation

Um die Expression der Kandidatengene unter Druckbedingungen später quantifizieren zu können musste zunächst mRNA aus den Zellen, mit denen das Druckexperiment durchgeführt wurde, isoliert werden. Hierzu wurde direkt im Anschluß an die Druckbehandlung 1ml Tri-Reagent zu jedem well direkt auf die Zellen gegeben und das Lysat mehrmals durchpipettiert. Die Lysate wurden in je ein RNase-freies 2ml-Tube überführt. An dieser Stelle wurde das

weitere Prozedere zwecks Rücktransport der Proben an den Arbeitsplatz abermals für ca. 120 Minuten unterbrochen. Danach wurden jeweils 0,4ml Chloroform zu den Ansätzen pipettiert, die Proben für je 15 Sekunden gevortext und für weitere 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die anschließende Phasentrennung wurden die Ansätze für 15 Minuten bei 4°C und 12.000g zentrifugiert. Die obere Phase wurde möglichst vollständig in je ein neues 2ml-Tube überführt und mit je 1 Volumen Isopropanol gemischt. Anschließend wurde alles wieder für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals für 15 Minuten bei 4°C und 12.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, es wurde je 1,5ml gekühltes (4°C) 70%iges Ethanol dazugegeben und gevortext. Dann wurden die Ansätze für 5 Minuten bei 4°C und 7.500g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Die Pellets wurden für 15 Minuten bei 55°C in je 25µl ultrapure H₂O gelöst und die resultierenden mRNA-Konzentrationen mit einem BioPhotometer gemessen. Wenn keine direkte Weiterverarbeitung erfolgte, wurden die mRNA-Proben bei minus 80°C eingelagert.

3.2.6 cDNA-Synthese

Zur Durchführung der quantitativen realtime-PCR musste aus der aus dem Druckexperiment isolierten mRNA cDNA gewonnen werden. Dies geschah durch Umschreiben mittels reverser Transkriptase. Je umzuschreibender cDNA wurden 2µg der vorher isolierten mRNA eingesetzt und mit ultrapure H₂O auf 7µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 5µl Random Hexameren (20ng/µl) wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Danach wurden jeweils 4µl 5x 1st strand buffer, 2µl DTT (0,1M) sowie 1µl dNTPs (10mM) dazupipettiert und alles für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur und danach für 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 1µl SuperScript II und vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz für 60 Minuten bei 42°C, anschließend sofort für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Dann wurde 1µl RNase H hinzugegeben, abermals vorsichtig gemischt und der Ansatz für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur weiteren Verwendung wurde die cDNA im Verhältnis 1:5 mit ultrapure H₂O verdünnt. Falls keine direkte Weiterverwendung erfolgte, wurde die cDNA bei minus 20°C eingelagert.

3.2.7 quantitative realtime-PCR

Die quantitative realtime-PCR wurde durchgeführt um eine Bestimmung der möglichen Expressionsänderung in glatten Blasenmuskelzellen unter hydrostatischem Druck zu ermöglichen.

Hierfür wurde zunächst für jede zu untersuchende cDNA ein Mastermix, bestehend aus einem Teil cDNA (verdünnt), 4 Teilen ultrapure H₂O und 5 Teilen Sybr green, hergestellt. Dann wurden pro cDNA-Probe für jedes zu untersuchende Gen 18µl des Mastermix in ein well einer 96-well PCR-Platte pipettiert und anschließend je 1µl des forward und reverse Primers des entsprechenden Gens dazugegeben. No-template Kontrollen, bestehend aus Sybr green und ultrapure H₂O wurden mit einbezogen. Als Haushaltsgen diente TBP (TATA-Box-binding-protein). Vor Beginn der PCR wurde die 96-well-Platte mit selbstklebender Klarsichtfolie versiegelt und die Platte für 2 Minuten bei 2000rpm zentrifugiert. Alle vorgenannten Arbeitsschritte bis zur Zentrifugation wurden auf Eis und alle Pipettiervorgänge mit PCR-Pipettenspitzen mit Filter durchgeführt.

Während der anschließenden PCR wurden die Ct-Werte und Schmelzkurven vom Cyclex in Echtzeit gemessen und von einem angeschlossenen Computer aufgezeichnet.

3.2.8 Auswertung:

3.2.8.1 *BrdU Proliferationsassay*

In die Auswertung des Proliferationsassays flossen Werte aus Einzelversuchen von 5 Zelllinien Detrusor und 3 Zelllinien Trigonum ein. Die 3 Trigonumproben waren jeweils korrespondierend zu einer der Detrusorproben.

Die gemessenen Lumineszenzwerte wurden zunächst hintergrundbereinigt, d.h. der Mittelwert der Hintergrundkontrollen wurde von allen weiteren Rohwerten abgezogen. Die Werte wurden anschließend kontrollnormiert, und zwar dergestalt, daß für jede Zelllinie die hintergrundbereinigten Rohwerte der verschiedenen PDGF-BB-Konzentrationen als Vielfaches der jeweiligen experimentellen Kontrolle ausgedrückt wurden. Für die Darstellung und Interpretation der Ergebnisse wurde von einer nicht-normalverteilten Grundgesamtheit ausgegangen, daher erfolgte die Darstellung als Median bzw. modifizierter Box-Plot.

3.2.8.2 *quantitative realtime-PCR*

In die Auswertung flossen Werte aus Einzelversuchen von jeweils drei Zelllinien Detrusor und Trigonum ein, von denen jeweils zwei korrespondierende Linien vom selben Patienten stammten und jeweils eine Linie von unterschiedlichen Patienten. Die Werte wurden normiert, indem der Wert des Haushaltsgens von jedem anderen Wert abgezogen wurde. Die relative Expression der einzelnen Gene wurde durch potenzieren von 2 mit dem negatierten erhaltenen Wert berechnet. Die fold induction nach Druckbehandlung der Zellen wurde aus dem Quotienten der relativen Expressionen mit und ohne Druckbehandlung berechnet.

Auch hier wurde von einer nicht-normalverteilten Grundgesamtheit ausgegangen, die Darstellung der Ergebnisse erfolgte analog zu Punkt 3.2.8.1

4 Ergebnisse

4.1 Immunfluoreszenzfärbung

4.1.1 Detrusor



Abbildung 4.1: Färbung muscle actin



Abbildung 4.2: Negativkontrolle IgG

4.1.2 Trigonum

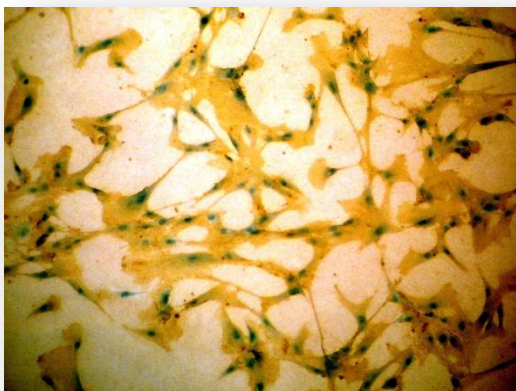


Abbildung 4.3: Färbung muscle actin



Abbildung 4.4: Negativkontrolle IgG

Eine Charakterisierung der verwendeten Zellen als Muskelzellen konnte bei allen in die Auswertung einbezogenen Zelllinien erfolgreich durchgeführt werden. Die Abbildungen zeigen Beispiele für positive Färbungen bei Detrusor- und Trigonumzellen.

4.2 BrdU Proliferationsassay

4.2.1 Detrusor

Änderung der Proliferation nach PDGF-Inkubation (Median)

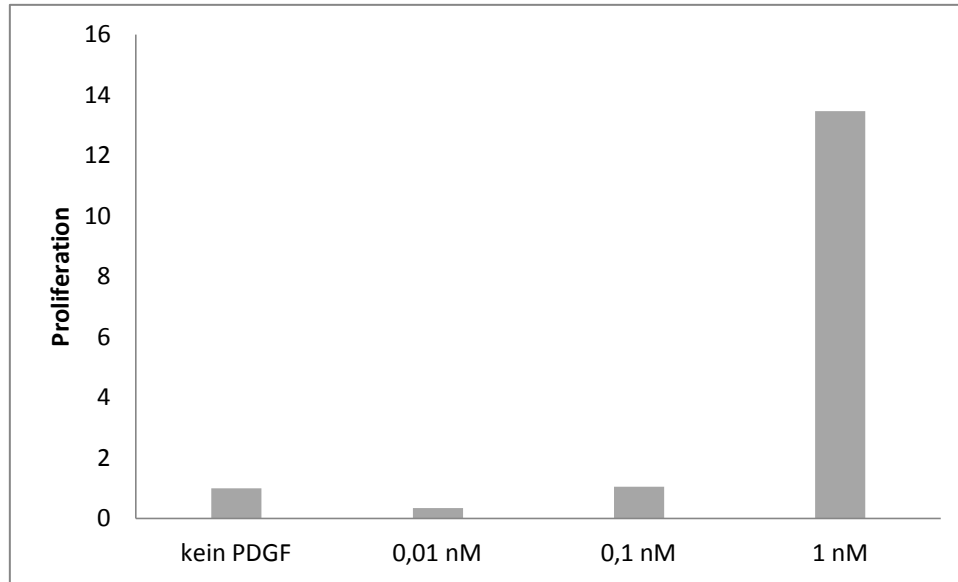


Abbildung 4.5: Darstellung der Ergebnisse für die Detrusorzellen als Medianwert, also desjenigen Einzelmeßwertes, bei dem jeweils 50% der übrigen Meßwerte oberhalb sowie unterhalb liegen. Es zeigt sich in dieser Darstellung ein optisch ausgeprägter Unterschied zur Behandlung der Zellen mit PDGF in einer Konzentration von 1nM im Vergleich zu den übrigen untersuchten Konzentrationen in Form einer deutlich höheren Zellproliferation. Bezogen auf die Negativkontrolle (=1) zeigt die kleinste Konzentration (0,01nM) sogar eine geringere Proliferationsrate.

Änderung der Proliferation nach PDGF-Inkubation (Box-Plot)

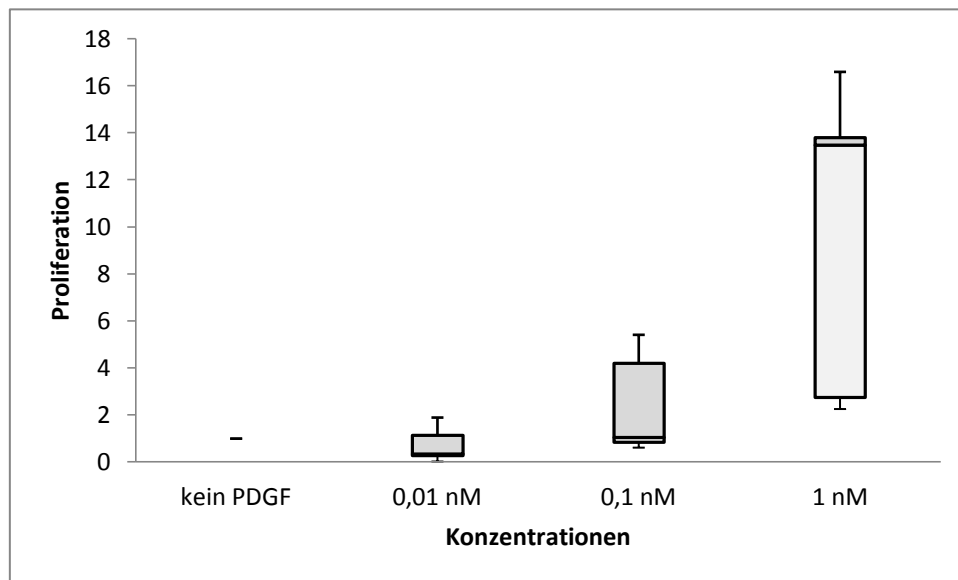


Abbildung 4.6: Durch die Darstellung der Gesamtergebnisse im Box-Plot ergibt sich ein differenzierteres Bild: auch hier zeigt sich wieder die Grundtendenz, daß die Proliferation von Detrusorzellen durch Behandlung mit PDGF gesteigert wird.. Zusätzlich sieht man jedoch auch eine mit der Konzentration zunehmende Streuung der Meßwerte, die ein eher ungleichmäßiges Verteilungsmuster aufweist. Die in der Medianwertdarstellung gewonnenen Eindrücke, daß eine PDGF-Konzentration von 0,01nM die Zellproliferation möglicherweise hemmt, sowie daß bei 0,1nM kein sichtbarer Effekt auf die Proliferation vorliegt, können in dieser Abbildung nicht eindeutig nachvollzogen werden. Inkubation mit PDGF in einer Endkonzentration von 1nM zeigt auch in dieser Darstellung trotz der großen Streuung den größten stimulierenden Effekt auf die Proliferation der Zellen.

4.2.2 Trigonum

Änderung der Proliferation nach PDGF-Inkubation (Median)

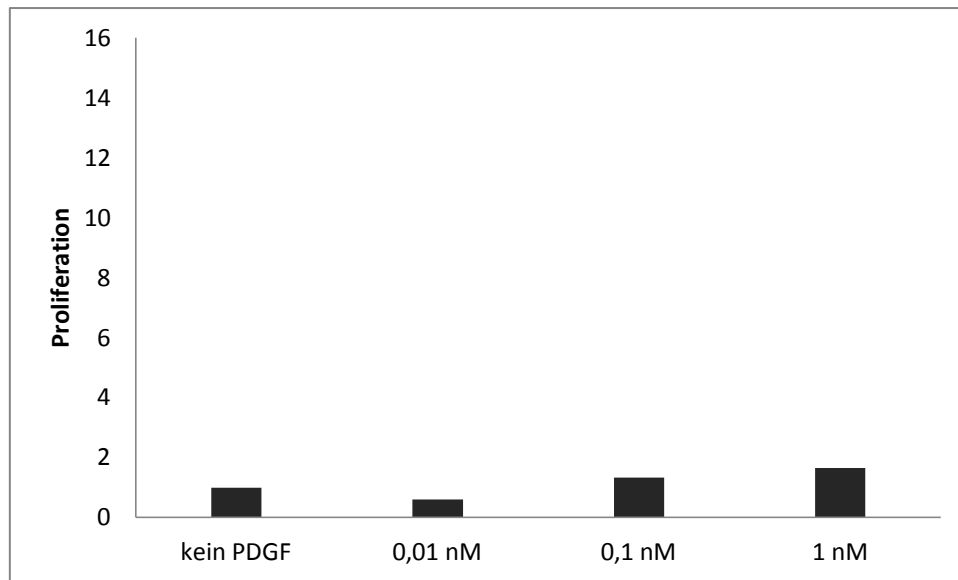


Abbildung 4.7: Darstellung der Medianwerte der Meßergebnisse für Trigonumzellen. Hier zeigt sich ein allenfalls geringer Effekt auf die Zellproliferation durch Behandlung mit PDGF, auch in höheren Konzentrationen. Die Proliferationsrate bei 0,01nM liegt auch hier unterhalb der Negativkontrolle, bei den beiden höheren Konzentrationen leicht oberhalb.

Änderung der Proliferation nach PDGF-Inkubation (Box-Plot)

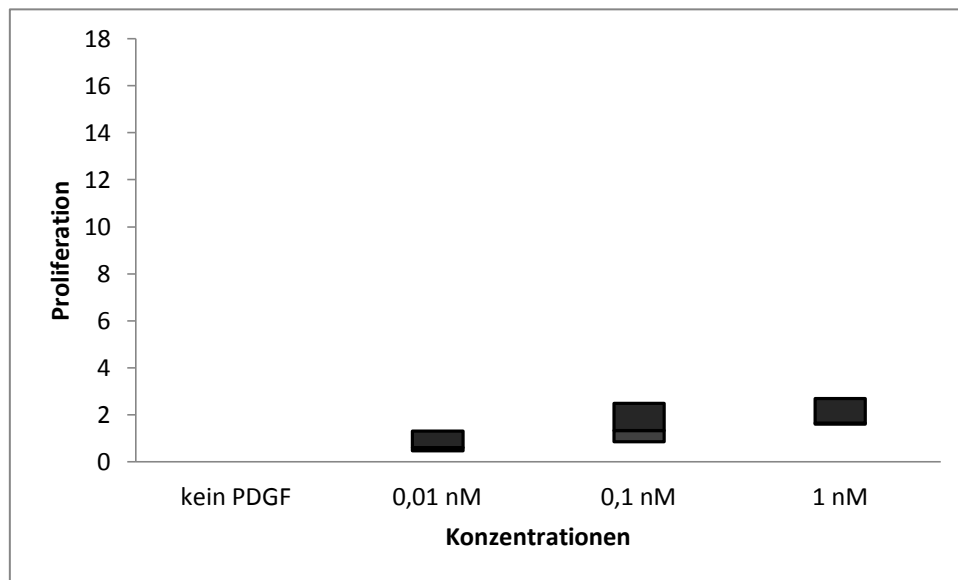


Abbildung 4.8: Die Darstellung der Gesamtergebnisse im Box-Plot erfolgte hier leicht modifiziert ohne oberen und unteren „Whisker“, da für die Trigonumzellen lediglich drei Meßreihen vorlagen. Man erkennt analog zur Medianwertdarstellung einen allenfalls geringen stimulierenden Effekt auf die Zellproliferation, der mit der Endkonzentration von PDGF zu korrelieren scheint. Eine ausgeprägte Streuung der Meßwerte zeigt sich nicht. Auch hier relativiert sich der Eindruck aus der Medianwertdarstellung, die geringste PDGF-Konzentration 0,01nM könnte einen negativen Effekt auf die Zellproliferation haben.

4.2.3 Vergleich zwischen Detrusor und Trigonum

Zellproliferation unter PDGF - Vergleich der Medianwerte

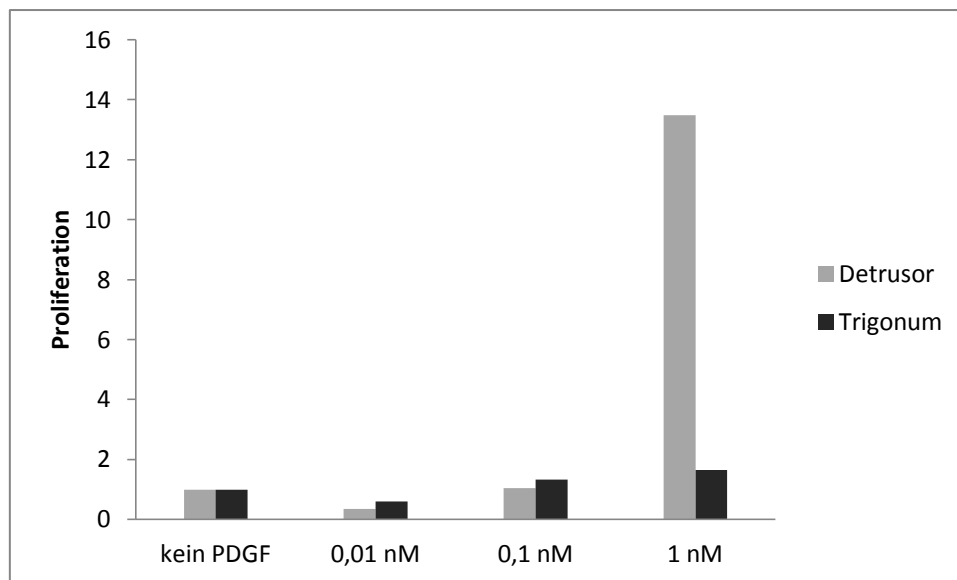


Abbildung 4.9: In diesem Vergleich der vorher dargestellten Medianwerte zeigt sich deutlich als herausragender Punkt die Steigerung der Proliferation von Detrusorzellen nach einer Behandlung mit 1nM PDGF, wohingegen die Steigerung der Proliferation von Trigonumzellen unter denselben Bedingungen im Vergleich kaum nennenswert erscheint. Bei den beiden anderen untersuchten Konzentrationen ergeben sich in dieser Darstellung keine wesentlichen Unterschiede zwischen Detrusor und Trigonumzellen.

Zellproliferation unter PDGF - Vergleichende Darstellung im Box-Plot

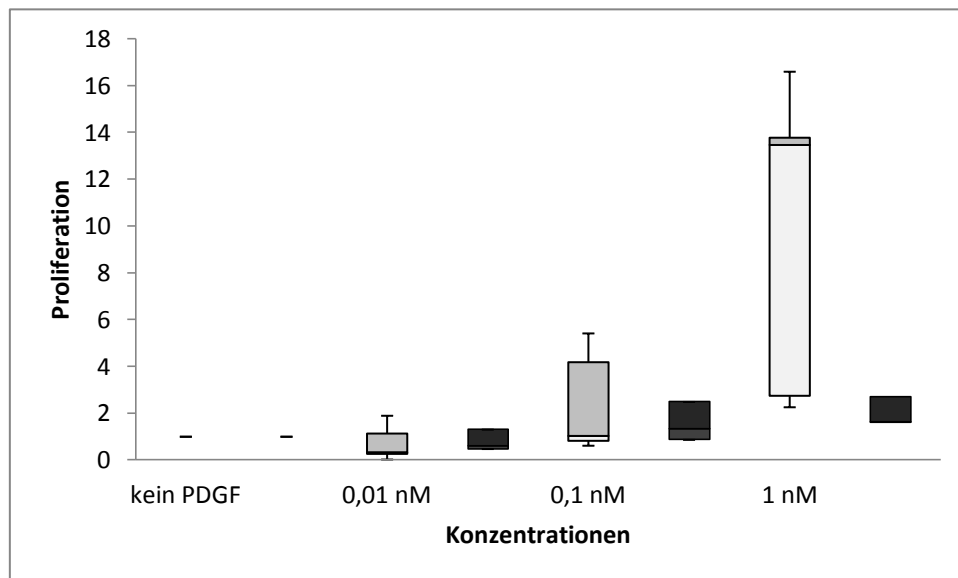


Abbildung 4.10: Auch im Box-Plot ergibt sich trotz der größeren Streuung der Detrusor-Werte eine Überschneidung mit dem korrespondierenden Trigonum-Plot bei 1nM lediglich im Bereich des unteren „Whisker“ und somit ein erheblicher Unterschied im Ansprechen der Zellen auf Behandlung mit 1nM PDGF. Bei den beiden anderen Konzentrationen sind die Überschneidungen zu den Trigonum-Werten deutlich größer, so daß man bei 0,01 nM von keinem Unterschied im Ansprechen auf PDGF sprechen kann. Bei 0,1nM zeigt sich zwar bei den Detrusorzellen eine stärkere Tendenz nach oben bzgl. der Zellproliferation, aufgrund der dennoch großen Überschneidung mit den entsprechenden Trigonum-Werten sind Aussagen bzgl. unterschiedlichem Verhalten der beiden Zelltypen bei dieser Wachstumsfaktorkonzentration eher zurückhaltend zu treffen.

4.3 Druckexperiment und quantitative realtime-PCR

Um zunächst einen Eindruck zu gewinnen, welche der untersuchten Gene überhaupt in Detrusor- und Trigonumzellen in relevantem Maße exprimiert werden, wird hier zunächst die Expression für jedes Zielgen im Verhältnis zum Haushaltsgen (TBP) ohne vorherige Druckbehandlung dargestellt. Auf Grundlage dessen werden dann im zweiten Schritt die Unterschiede der Expression ausgewählter Gene ohne und mit Druckbelastung der Zellkulturen dargestellt (fold induction).

4.3.1 Detrusor

Relative Expression von PDGFB und PDGFR α/β (Median)

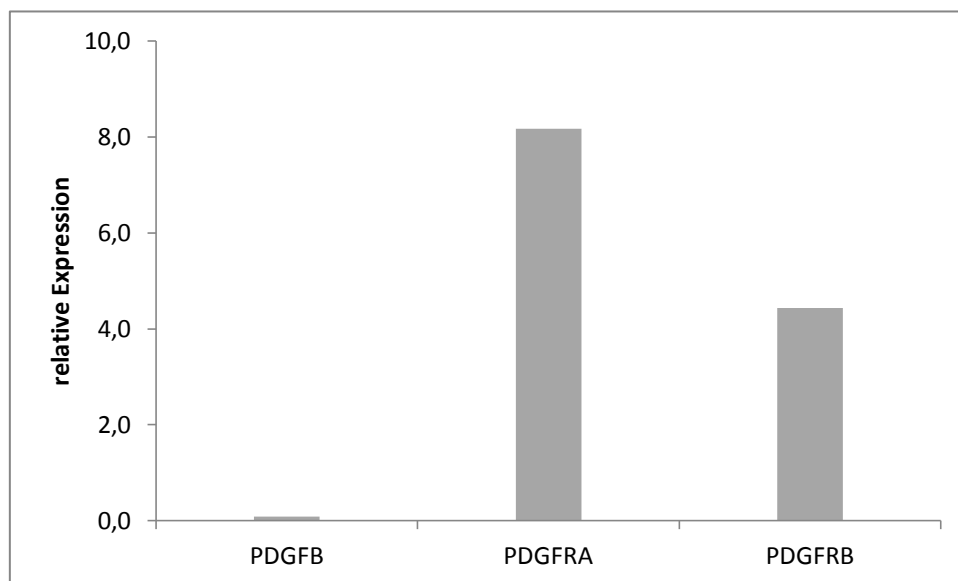


Abbildung 4.11: Grafische Darstellung der Medianwerte der relativen Expression der Ligandenuntereinheit PDGF-B, sowie der beiden Rezeptoruntereinheiten ohne Druckbelastung (Kontrollgruppe) im Verhältnis zum Haushaltsgen. Es zeigt sich, daß die Rezeptoruntereinheiten im untersuchten Gewebe stark exprimiert werden, die Ligandenuntereinheit jedoch nicht.

Relative Expression der restlichen Wachstumsfaktoren/-untereinheiten (Median)

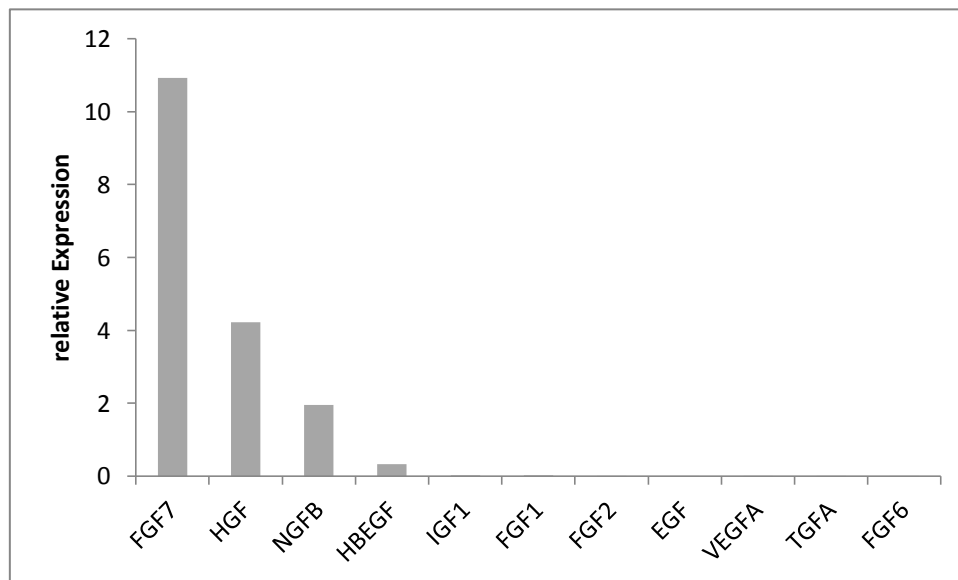


Abbildung 4.12: Darstellung der relativen Expression der übrigen untersuchten Liganden bzw. Ligandenuntereinheiten(Medianwert). Lediglich der FGF7, der HGF und der NGFB, sowie in geringerem Maße noch der HBEGF weisen eine relevante Expression im Verhältnis zum Haushaltsgen auf. Die übrigen Wachstumsfaktoren wurden in den untersuchten Detrusorzellen- so wie auch PDGFB- nicht exprimiert.

Relative Expression der restlichen Rezeptoren/-untereinheiten (Median)

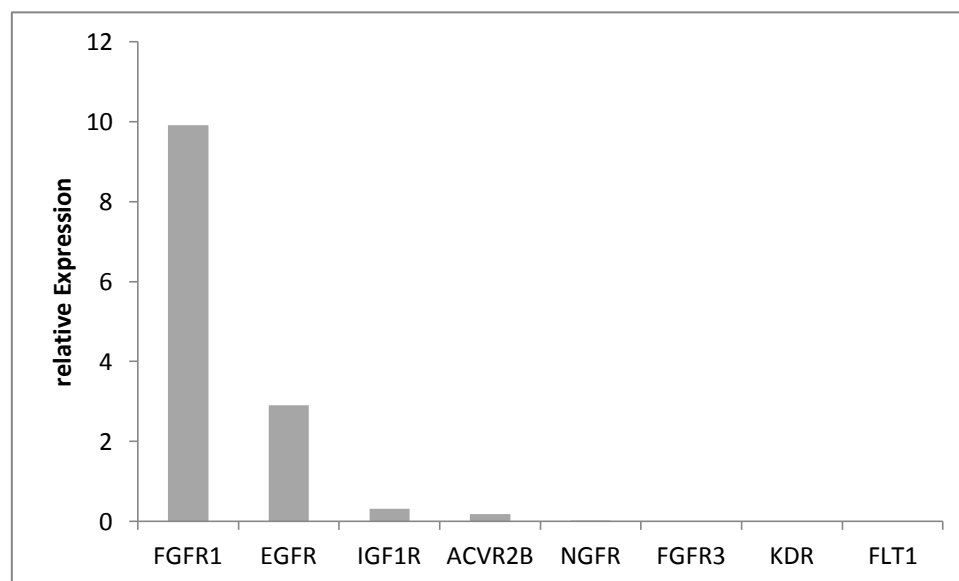


Abbildung 4.13: Hier dargestellt sind die Medianwerte der relativen Expression der korrespondierenden Rezeptoren bzw. Rezeptoruntereinheiten der untersuchten Zytokine. Eine starke Expression in den untersuchten Detrusorzellen wiesen der FGFR1 und der EGFR auf. Weniger stark wurden IGF1R und ACVR2B exprimiert, die übrigen Rezeptoren nicht in relevantem Ausmaß.

Relative Expression der CCN-Gene und LIF (Median)

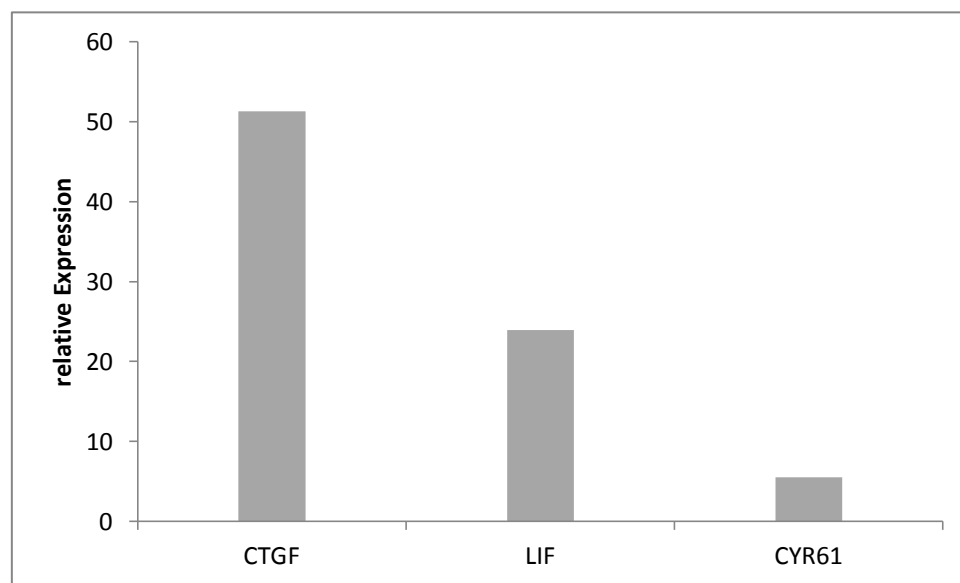


Abbildung 4.14: Aufgetragen ist die relative Expression (Medianwert) der sogenannten CCN-Gene und des LIF. Gut zu erkennen ist, daß alle drei untersuchten Gene in Detrusorzellen stark exprimiert werden.

Fold induction nach 1 h Druckbelastung (Median)

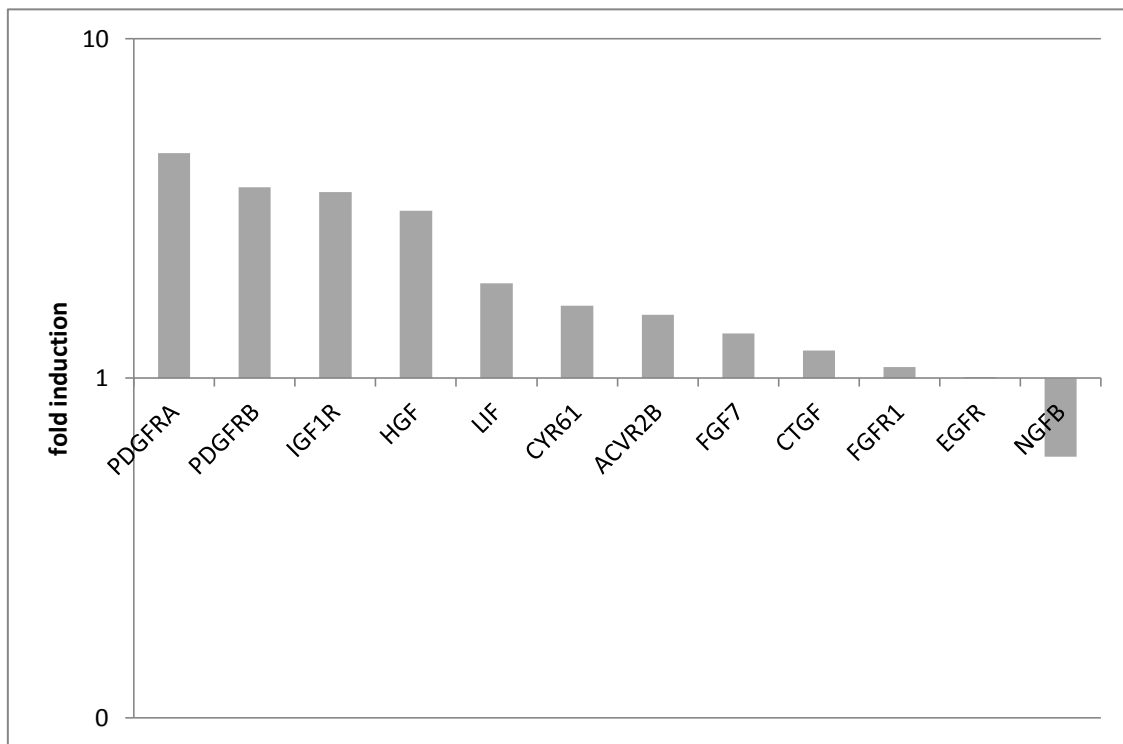


Abbildung 4.15: Hier dargestellt sind die Medianwerte der foldinduction, d.h. der Faktor um den sich die Expression der jeweiligen Gene in den Detrusorzellen nach einer Stunde Druckbelastung steigerte oder verringerte. Mit einbezogen die die grafische Darstellung sind hier zunächst alle Gene, die eine relevante relative Expression in Detrusormuskelzellen aufwiesen. Für die Darstellung wurde eine logarithmische Skalierung der Y-Achse gewählt, um etwaige negative Effekte auf die Genexpression im richtigen Verhältnis abbilden zu können. Die X-Achse schneidet beim Y-Wert „1“, da eine Veränderung um den Faktor eins einer unveränderten Genexpression entspricht. Zu sehen ist hier, daß bei den beiden PDGF-Rezeptoruntereinheiten, sowie beim IGF1-Rezeptor eine deutliche Steigerung der Expression nach Druckbelastung vorliegt, die übrigen Rezeptoren weisen keine oder eine nur geringe Veränderung der Genexpression auf. Von den Liganden sticht der HGF mit einer deutlichen Steigerung der Expression heraus, die Expression des NGFB scheint hingegen verringert. Beim FGF7 ergab sich eine sehr geringe Steigerung der Expression. Die CCN-Gene zeigen alle eine geringfügig ansteigende Expression, so wie auch der LIF.

Fold induction nach 1h Druckbelastung (Box Plot)

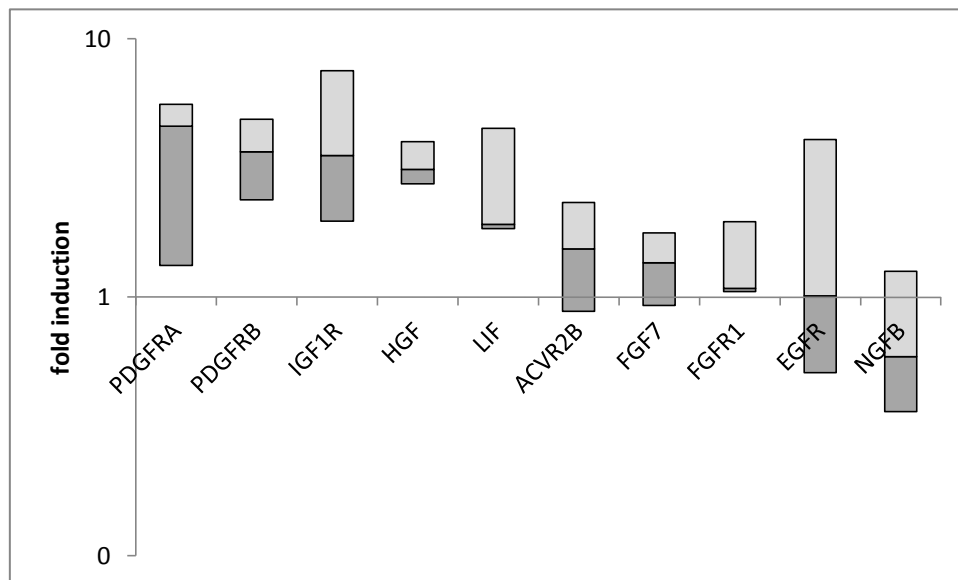


Abbildung 4.16: Hier sind die Ergebnisse sämtlicher Meßreihen als modifizierter Boxplot dargestellt. Der mittlere Balken stellt den Medianwert dar. Mit einbezogen in die Darstellung sind hier die oben angeführten Rezeptoren und Liganden, sowie der LIF. In der Darstellung der Gesamtergebnisse zeigt sich, daß die Beobachtung einer Steigerung der Genexpression nach Druckbelastung sich im wesentlichen auf die 5 zuerst angeführten Gene beschränkt, also beide PDGF-Rezeptoruntereinheiten, den IGF1-Rezeptor, den HGF und den LIF. Die übrigen Gene überschneiden mit dem jeweiligen Boxplot die X-Achse, also den Wert „1“, was einer unveränderten Expression entspräche, bzw. liegen sehr nahe daran.

4.3.2 Trigonum

Relative Expression von PDGFB und PDGFR α/β (Median)

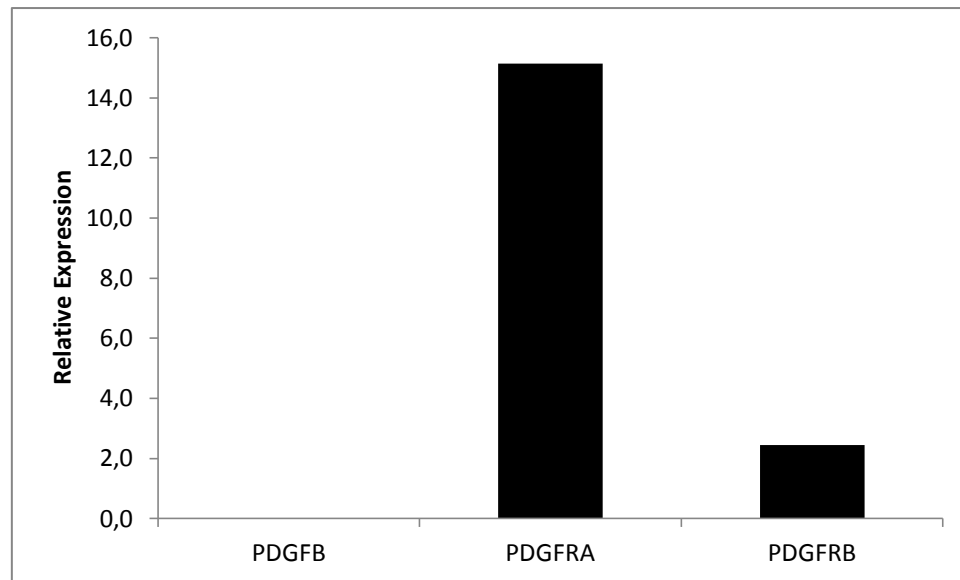


Abbildung 4.17: Analog zur Darstellung im vorigen Abschnitt, ist hier die relative Expression von PDGFB und der beiden Rezeptoruntereinheiten in Trigonumzellen ohne vorherige Druckbelastung dargestellt. Auch hier zeigt sich eine deutliche Expression beider Rezeptoruntereinheiten, jedoch keine Expression von PDGFB.

Relative Expression der restlichen Wachstumsfaktoren und Rezeptoren (Median)

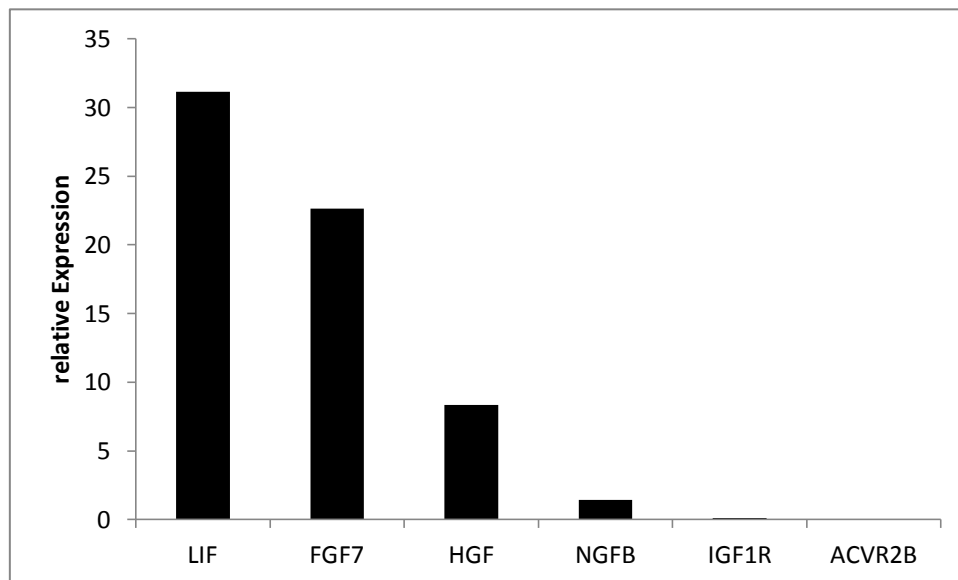


Abbildung 4.18: Hier dargestellt die relative Expression der übrigen untersuchten Gene. Da der Vergleich zwischen Detrusor- und Trigonumzellen ein zentraler Punkt der vorliegenden Arbeit ist, wurden in diese Darstellung nur Gene einbezogen, die auf Grundlage der im vorigen Abschnitt dargestellten Ergebnisse für einen Vergleich mit den korrespondierenden Daten von Detrusorzellen in Frage kamen. Es zeigt sich hier eine relevante relative Expression aller untersuchten Gene, beim IGF1R und ACVR2B geringer ausgeprägt, ähnlich wie in den Detrusorzellen (Expression der beiden letztgenannten Gene hier schlechter sichtbar aufgrund höherem Y-Achsen-Maximum)

Fold induction nach 1h Druckbelastung (Median)

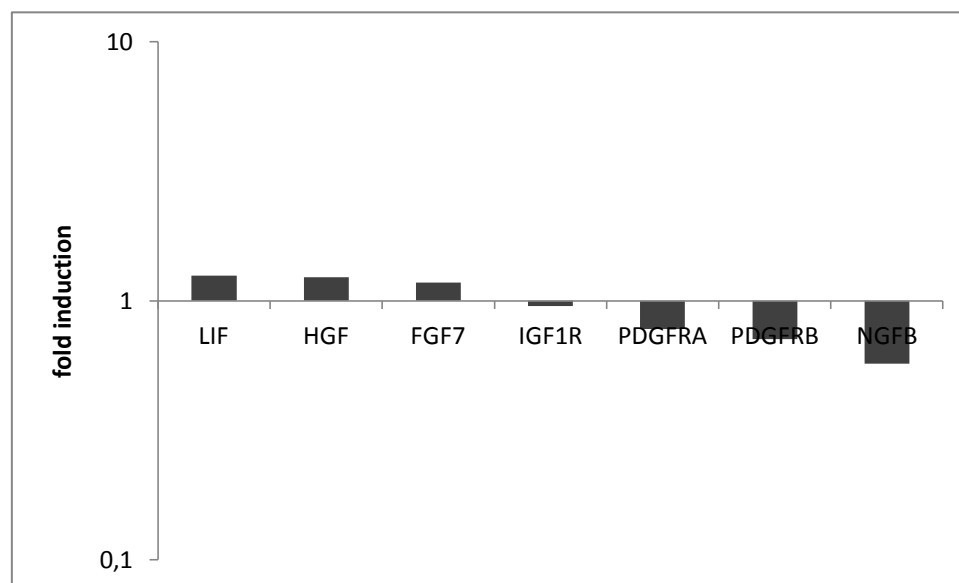


Abbildung 4.19: Darstellung der Änderung der Genexpression (Medianwerte) der untersuchten Gene in Trigonumzellen nach 1 Stunde Druckbelastung als Vielfaches der ursprünglichen Expression (fold induction), auch hier wieder mit logarithmischer Skalierung der Y-Achse. Es zeigt sich hier eine allenfalls geringe Änderung der Genexpression der verschiedenen Gene, beim PDGF-Rezeptor sogar ein geringfügiger Rückgang.

Fold induction nach 1h Druckbelastung (Box plot)

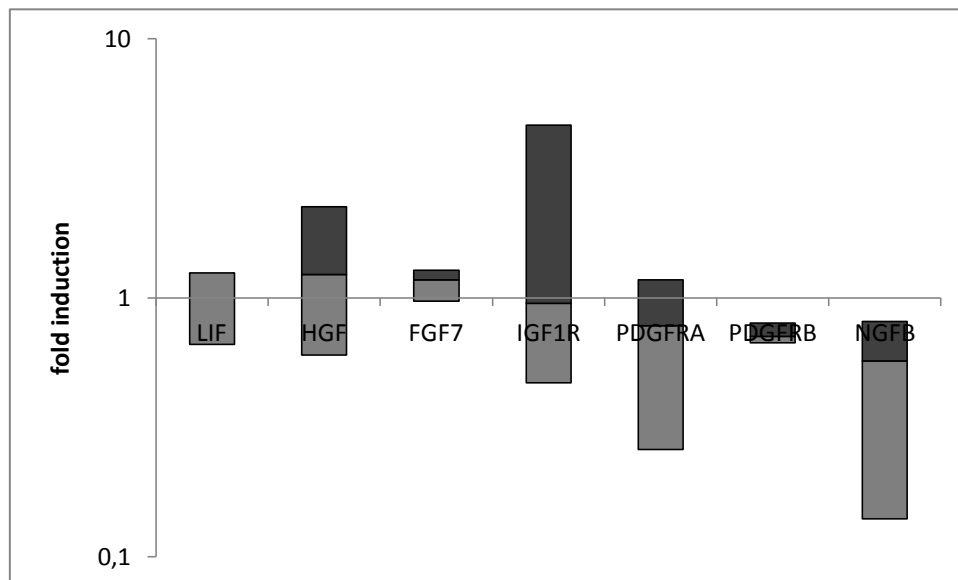


Abbildung 4.20: Darstellung der Gesamtergebnisse der drei Trigonum-Meßreihen als Boxplot. Der mittlere Balken stellt auch hier den Medianwert dar. Die PDGFRB-Untereinheit, sowie der NGFB zeigen einen sichtbaren Rückgang der Genexpression nach Druckbelastung, der PDGFRB weist hierbei eine sehr geringe Streuung der Meßergebnisse auf, was für eine gute Reproduzierbarkeit dieser Beobachtung spricht. Alle anderen Boxplots schneiden die X-Achse nah am Medianwert, so daß bei ihnen davon auszugehen ist, daß die Genexpression sich nach Druckbelastung nicht wesentlich ändert. Allenfalls bei der PDGFRA-Untereinheit zeigt sich optisch eine Tendenz in Richtung einer verringerten Genexpression.

4.3.3 Vergleich zwischen Detrusor und Trigonum

Vergleich der Medianwerte der fold induction

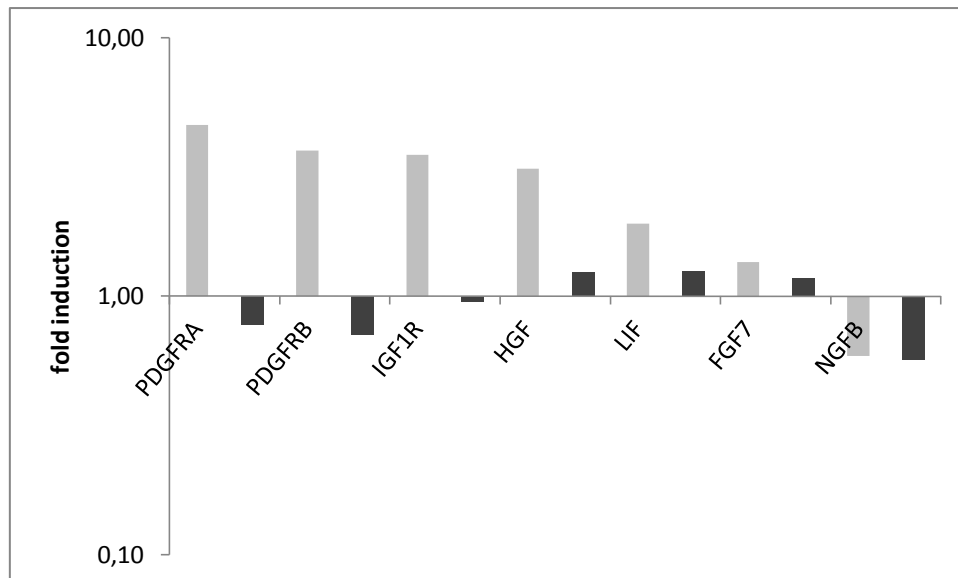


Abbildung 4.21: Vergleichende Darstellung der Medianwerte der fold induction nach 1 Stunde Druckbelastung in Detrusor- (hell) bzw. Trigonumzellen (dunkel). Die Expression von FGF7 ändert sich gleichsam in Detrusor- und Trigonumzellen nicht oder nur unwesentlich, die Expression von NGFB geht in beiden Zelltypen gleichermaßen zurück. In allen übrigen Genen zeigt sich eine deutliche Diskrepanz in der Reaktion auf Druckbelastung: während die Expression der Gene in Detrusorzellen stark ansteigt, kommt es in Trigonumzellen zu keiner Veränderung.

Vergleich der fold induction im Box plot

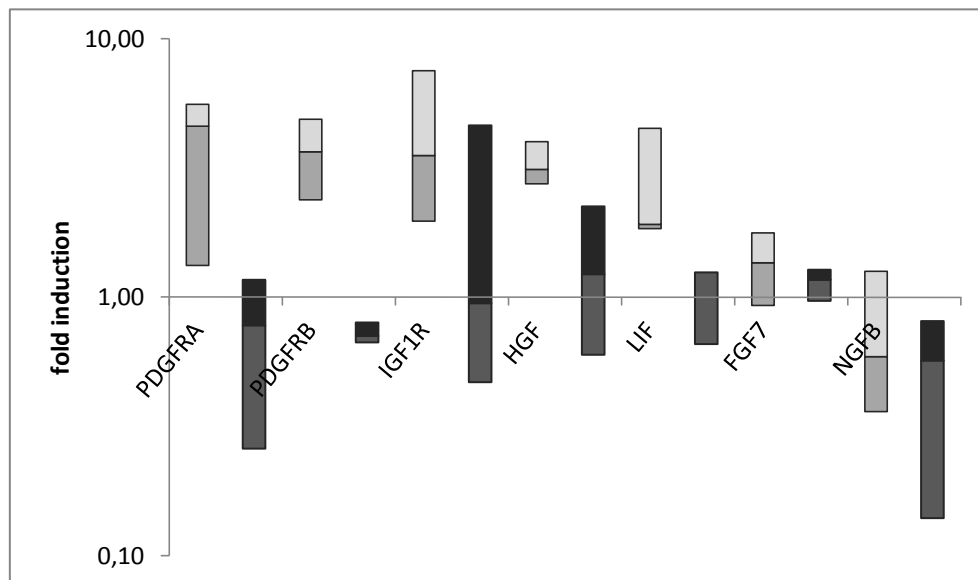


Abbildung 4.22: In derselben Art und Weise wie oben sind hier die Boxplot-Darstellungen der gesamten Meßreihen von Detrusor(hell) und Trigonum (dunkel) nebeneinandergestellt. Die in den vorigen Abbildungen gemachten Beobachtung erhärten sich hier im Bezug auf PDGFRA, PDGFRB, HGF und LIF, und zwar dergestalt, daß in Detrusorzellen die Expression der genannten Gene nach Druckbelastung deutlich ansteigt, wohingegen sie in Trigonumzellen gleichbleibt oder sogar abnimmt (PDGFRB). Sehr gut nachvollziehen läßt sich die unterschiedliche Reaktion der beiden Zelltypen in der obigen Abbildung dadurch, daß bei diesen 4 Genen keine Überschneidung der jeweils korrespondierenden Plots von Detrusor und Trigonum vorliegt. Beim IGF1R zeigt sich zwar ein ähnlicher Unterschied wie bei den vorgenannten Genen, jedoch liegt aufgrund der großen Streuung der Ergebnisse eine deutliche Überschneidung von Detrusor- und Trigonum-Boxplot vor, so daß dieser Unterschied sich grafisch eher relativiert. Beim FGF7 überschneiden beide Plots die X-Achse, sowie sich gegenseitig vollständig, so daß sich sagen läßt, daß in beiden Gewebetypen gleichermaßen keine nennenswerte Änderung der Expression dieses Gens vorliegt. Beim NGFB überschneiden sich beide Boxplots, auch hier scheint kein relevanter Unterschied zwischen Detrusor und Trigonum vorzuliegen.

5 Diskussion

Am Anfang der Arbeit stand, wie bereits dargelegt, die Untersuchung der mitogenen Wirkung von PDGF auf glatte Muskelzellen der Blase, wobei zum einen bislang gewonnene Erkenntnisse erhärtet und vertieft werden, aber auch neue Beobachtungen, insbesondere bezüglich eines etwaigen Unterschiedes im Ansprechen auf PDGF-BB zwischen Detrusor- und Trigonumzellen, gemacht werden sollten. Die für diesen Abschnitt wichtigste bislang veröffentlichte Untersuchung ist diejenige von Stehr et al. aus dem Jahre 2003[63]. Hier wurde zur Bestimmung des mitogenen Potentials von PDGF-BB auf glatte Muskelzellen der Harnwege ein sehr ähnlicher Ansatz gewählt wie in der vorliegenden Arbeit. Die Unterschiede hinsichtlich der Methodik bestehen zum einen darin, daß in der damaligen Arbeit hauptsächlich Zellkulturen aus Ratten untersucht, und an humanen Geweben lediglich Detrusorzellen kultiviert wurden. Darüber hinaus kam zur Messung der Zellproliferation ein H_3 -Thymidin-Assay zum Einsatz, in der vorliegenden Arbeit ein BrdU-Assay. Beide Versuchsansätze sind jedoch gut vergleichbar, da das Prinzip in beiden Fällen dasselbe ist, nämlich der direkte Einbau der Markersubstanz in die neu synthetisierte DNA der jeweiligen Zellen. Somit sind beide Methoden darüber hinaus sehr gut geeignet, um die hier gegebenen Fragestellungen zu untersuchen, da der Messwert über den Einbau der jeweiligen Substanz in die DNA der Zielzelle immer direkt mit dem Ausmaß der DNA-Synthese korreliert. Die Ergebnisse von Stehr et al. zeigten eine deutliche Erhöhung der DNA-Synthese in allen getesteten Zellkulturen nach Inkubation mit PDGF-BB in einer Endkonzentration von 1nM. Bei den aus Ratten kultivierten Zellen sprachen die Trigonumzellen stärker an als diejenigen aus dem Blasenkörper, bei den menschlichen Geweben fehlte wie erwähnt die Vergleichsmöglichkeit mit dem Trigonum. In der vorliegenden Arbeit konnten nun erstmals Zellkulturen aus humanem Detrusor und Trigonum unter diesem Aspekt direkt verglichen werden. Wie im vorigen Abschnitt dargelegt, konnte zum einen das mitogene Potential von PDGF-BB auf glatte Muskelzellen der Harnblase bestätigt werden, da beide Zelltypen eine signifikante Erhöhung der BrdU-Inkorporation und damit der DNA-Synthese unter Inkubation mit 1nM PDGF-BB zeigten. Zum anderen konnte beobachtet werden, daß die Detrusor-Zellkulturen signifikant stärker proliferierten als die Trigonumzellen. Der Unterschied zu den vorherigen Untersuchungen an Ratten könnte zum einen durch den unterschiedlichen untersuchten Organismus und die nicht vollständig gegebene Übertragbarkeit vom Rattenmodell auf den Menschen erklärt werden. Andererseits könnte auch die Gewinnung von Zellkulturen aus neugeborenen Ratten eine Rolle gespielt haben, da

in jungen Organismen oftmals zum Teil andere Zytokine und Signalwege aktiv sind als in adulten. Die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen decken sich – unter der Voraussetzung, daß der PDGF pathogenetisch beteiligt ist – mit dem klinischen Bild der Muskelhypertrophie und -hyperplasie, da hierbei vor allem der Detrusormuskel betroffen ist.

Als Schwachpunkt in den hier präsentierten Daten muß die große Streuung der Meßergebnisse für die PDGF-BB-Konzentration 1nM beim Detrusor genannt werden, die vor allem dadurch zustande kam, daß 2 der 5 untersuchten Detrusor-Zelllinien in einem sehr ähnlichen Bereich auf niedrigem Niveau lagen und die restlichen 3 in einem wiederum sehr engen Bereich auf hohem Niveau. Dies läßt die Vermutung im Raum, daß außer der Herkunft der jeweiligen Zellen aus Detrusor und Trigonum noch andere Faktoren Einfluß auf die Stimulierbarkeit durch PDGF-BB haben, die hier nicht erfaßt wurden. Abschließend muß jedoch festgehalten werden, daß trotz dieser Schwachstelle ein deutlicher Unterschied in der Antwort von Detrusor und Trigonum auf PDGF festgestellt wurde und dieser Unterschied anhand der vorliegenden Daten lediglich nicht genauer quantifiziert werden kann. Die hier anhand der gemachten Beobachtungen gezogenen Schlüsse sind daher durchaus zulässig.

Weiterhin wurde im nächsten Schritt die Änderung der Expression ausgewählter Kandidatengene nach 1 Stunde Druckbelastung von aus humanem Detrusor und Trigonum kultivierten Zellen mit 100mmHg gemessen. Zu diesem und ähnlichen Themen existiert bereits eine Reihe von Veröffentlichungen, so daß ebenfalls eine große Bandbreite an verschiedenen Methoden bisher zur Anwendung gekommen ist, die zwecks besserer Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Arbeit einer näheren Betrachtung bedarf. Die bisher veröffentlichten Ansätze unterscheiden sich zum einen durch die Betrachtung eines in-vivo, ex-vivo- bzw. in-vitro-Modells. Die meisten Autoren arbeiteten wie hier mit einem in-vitro-Ansatz. Desweiteren unterscheiden sich bisherige Veröffentlichungen in Art, Dauer und Stärke des applizierten Drucks. So kam in fast allen in-vitro-Studien zyklischer Druck zur Anwendung, d.h. ein Wechsel zwischen Druck und Entspannung in einem Turnus von nur einigen Sekunden. Statischer Druck, wie er in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde, fand sich in der Literatur kaum, obgleich er der Physiologie der Harnblase sicherlich näher kommt als hochfrequenter zyklischer Druck, welcher eher bei experimentellen Studien mit glatter Gefäßwandmuskulatur sinnvoll ist. Die Dauer der Druckbelastung variierte in der Literatur von einigen Stunden bis hin zu Tagen und Wochen. Die Stärke des Drucks lag in den verschiedenen in-vitro Ansätzen im Bereich zwischen 40cmH₂O und 200mmHg. Bei in- oder

ex-vivo-Modellen wurde in der Regel eine künstliche infravesikale Obstruktion erzeugt, ohne jedoch den resultierenden infravesikalen Druck genau zu bestimmen.

Im Folgenden sollen nun die hier präsentierten Ergebnisse des Druckexperiments im Abgleich mit Publikationen diskutiert werden, die zumindest vergleichbare Methodik zur Anwendung brachten und in denen eine ähnliche Gruppe von Zielgenen untersucht wurde. Zunächst sollen alle hier untersuchten Genfamilien außer dem PDGF und seinem Rezeptor besprochen werden. Dieser wird aufgrund seiner zentralen Rolle für diese Arbeit gesondert im Anschluß diskutiert. An den Anfang sei hier die bereits gut untersuchte EGF-Familie gestellt. In vorherigen Arbeiten wurde bereits mehrfach eine Erhöhung der Expression des HB-EGF in glatten Muskelzellen unter Druckbelastung beschrieben [48, 50]. In beiden zitierten Arbeiten arbeiteten die Autoren in-vitro mit zyklischem Druck in einer Frequenz von 0,1Hz, in einer der Arbeiten zusätzlich mit einem ex-vivo-Modell mit einem statischen intravesikalen Druck von 40cmH₂O [50]. Die untersuchte Dauer der Druckbelastung war in einem Fall nicht angegeben, im anderen [50] lagen die Meßpunkte bei 4h/8h (in-vitro-Ansatz) bzw. 1h-24h (ex-vivo-Ansatz). Zur Messung kamen semiquantitative Methoden [48] und quantitative realtime-PCR zum Einsatz [50]. In beiden Fällen wurde unter Druckbelastung ein deutlicher Anstieg in der Expression von HB-EGF beobachtet, sowohl in-vitro, als auch im ex-vivo-Modell. Über erhöhte Expression von EGF oder dem EGF-Rezeptor unter ähnlichen Bedingungen ist in der aktuellen Literatur nichts zu finden. In den unter Abschnitt 4 angeführten Daten der vorliegenden Arbeit ist zu erkennen, daß der EGF in den untersuchten Zellkulturen relativ zum Haushaltsgen nicht relevant exprimiert wurde der HB-EGF nur in geringem Ausmaß (hier, so wie auch im folgenden wurden alle PCR-Primer, die keine nennenswerte Amplifikation aufwiesen zum Ausschluß eines Materialmangels mit universal-cDNA positiv getestet), der EGFR hingegen in größerem Ausmaß. Eine erhöhte Expression nach Druckbelastung ließ sich jedoch hier nicht nachweisen. Trotz fehlendem Nachweis einer relevanten Expression von HB-EGF oder gar einer Steigerung derselben nach Druckbelastung sind die hier erzielten Daten mit dem aktuellen Stand der Literatur durchaus vereinbar, wenn man bedenkt, daß zum einen die Höhe des Drucks nach derzeitigem Kenntnisstand für die Art und Weise der Reaktion der Muskelzellen eine Rolle spielt [44, 45] und zum anderen eine unterschiedliche Reaktion von glatten Muskelzellen auf zyklischen und statischen Druck denkbar ist. Darüber hinaus ist der Beobachtungszeitraum in der vorliegenden Arbeit mit 1h sehr viel kürzer als in den meisten vorigen Publikationen, so daß hier nur sehr kurzfristige Reaktionen in der Zelle erfaßt werden konnten, was auch gewollt war. Zusammenfassend

kann man an dieser Stelle sagen, daß eine Rolle des HB-EGF und des EGF-Rezeptors im Proliferationsverhalten glatter Muskelzellen aufgrund des gegenwärtigen Wissensstandes angenommen werden kann, jedoch konnten im Rahmen dieser Arbeit, bis auf den Nachweis der Expression beider Gene in den untersuchten Zellkulturen, keine neuen Hinweise für diese These gesammelt werden.

Ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit sind die Gene der FGF-Familie. Exemplarisch wurden hier Vertreter untersucht, die laut Gendatenbank in Muskelgewebe exprimiert werden, namentlich FGF1, 2, 6 und 7, sowie die Rezeptoren FGFR1 und 3. Experimentelle Studien mit ähnlichem Ansatz ließen sich in der Literatur nicht finden. Im Rahmen der hier durchgeführten Versuche konnte in den untersuchten Detrusor-Zellkulturen eine Expression von FGF7 und FGFR1 nachgewiesen werden, jedoch keine sichtbare Änderung derselbigen nach Druckbelastung. Somit ergeben sich diesbezüglich keine Hinweise auf eine Beteiligung dieser Gene an einer frühen Reaktion der glatten Blasenmuskulatur auf hydrostatischen Druck.

Weiterhin untersucht werden sollten hier die CCN-Gene CTGF und Cyr61. In einer früheren Arbeit konnte ein Anstieg der Expression beider Gene in Blasenmuskulatur nach Druckbelastung nachgewiesen werden [53]. Hierfür wurde von den Autoren ein in-vivo-Ansatz am Rattenmodell mit künstlich erzeugter infravesikaler Obstruktion gewählt. Der Beobachtungszeitraum betrug mehrere Tage. Für die vorliegende Arbeit sollte untersucht werden, ob beide Gene auch in sehr kurzem Zeitraum einer Druckbelastung eine erhöhte Expression in Blasenmuskelgewebe aufweisen. Eine Expression beider Gene in den untersuchten Zellkulturen konnte zwar wiederum beobachtet werden, jedoch keine Änderung nach Druckbelastung. Für diese unterschiedlichen Beobachtungen könnte zum einen abermals der Unterschied Ratte/Mensch bzw. in-vivo/in-vitro verantwortlich sein. Zum anderen kann ebenfalls der Schluß naheliegen, daß beide Gene an der unmittelbaren Frühreaktion der Harnblasenmuskulatur nicht beteiligt, sondern erst im mittelfristigen Prozeß des Blasenwandumbaus involviert sind.

Da bis zu diesem Punkt keine Veränderungen der Genexpression in Detrusorzellen unter den dargestellten Versuchsbedingungen zu beobachten waren, wurden mit Ausnahme des FGF7 für die vorgenannten Gengruppen keine Vergleiche mit Trigonum-Zellkulturen angestellt.

Anders bei den folgenden Genen: für den LIF ist in einer früheren Arbeit, deren Methodik bereits weiter oben diskutiert wurde [50], eine Erhöhung der Expression unter zyklischer Druckbelastung beschrieben. Auch in den hier vorgestellten Versuchsergebnissen zeitigte eine einstündige Belastung mit statischem Druck eine Erhöhung der Expression des LIF in Detrusorzellen, nicht jedoch in Trigonumzellen. Die Differenzierung zwischen Detrusor und Trigonum ist neu, die Beobachtung der gesteigerten Expression von LIF nach Druckbelastung deckt sich mit der Literatur. Eine Beteiligung am pathologischen Prozeß der Blasenmuskelhypertrophie und -hyperplasie und vor allem ein Unterschied desselbigen zwischen Detrusor und Trigonum erscheinen für den LIF also durchaus denkbar.

Ein ähnliches, obgleich weniger aussagekräftigeres Bild ergab sich für den IGF1 und seinen Rezeptor, den IGF1R. Eine Erhöhung der Expression von IGF1 unter Druckbelastung ist in einigen Arbeiten vorbeschrieben [46, 47]. In einer der beiden Studien [46] wurden jedoch in einem in-vivo-Experiment lediglich mRNA-Konzentrationen gemessen, ohne sie mit der Expression eines Haushaltsgens zu normieren, so daß nicht vollständig geklärt ist, ob die Erhöhung in der Expression überhaupt auf einem relevanten Niveau stattfand. In der anderen Studie [47], die dem in dieser Arbeit gewählten Versuchsansatz ähnlicher ist, wurden wiederum längere Zeiträume an Druckbelastung zwischen 8h und 24h beobachtet. In den unter Abschnitt 4 illustrierten Daten findet sich nur eine recht geringe Expression von IGF1. Anders der entsprechende Rezeptor IGFR1, der nach mechanischer Belastung in Detrusorzellen verstärkt exprimiert wird. In Trigonumzellen zeigt sich keine eindeutige Änderung der Expression. In beiden Zelltypen gab es allerdings eine größere Streuung der Meßergebnisse mit gegenseitiger Überschneidung, so daß Aussagen bezüglich einer unterschiedlichen Reaktion nur eingeschränkt möglich sind. Zusammenfassend deuten die hier präsentierten Ergebnisse darauf hin, daß in der frühen Reaktion auf Druckbelastung glatte Blasenmuskelzellen durch Überexpression des Rezeptors sensitiver für IGF1 werden und – in Zusammenschau mit der eingangs angeführten Literatur – im weiteren Verlauf eine autokrine Stimulation durch Überexpression von IGF1 zwar denkbar erscheint. Hinweise für eine autokrine Stimulation fanden sich hier jedoch nicht. Daß die Überexpression des Rezeptors im ausschließlich im Detrusor, nicht aber im Trigonum stattfindet, deutet sich in den erhobenen Daten zwar deutlich an, aus o.g. Gründen ist eine sichere Beurteilung dieser Frage jedoch nicht möglich.

Bisher im Rahmen von experimentellen Studien zum Thema Blasenmuskelhypertrophie/-plasie nicht untersucht worden ist der HGF. Er steht in der aktuellen Literatur wie in der Einleitung bereits erwähnt im Fokus der Krebsforschung. Eine proliferationsfördernde Wirkung auf glatte Muskulatur ist für ihn bislang nicht expressis verbis beschrieben. Sehr wohl jedoch wird ihm wie gesagt eine solche bzw. auch migrations- und invasionsfördernde Wirkung auf verschiedene Karzinomzellarten zugesprochen, unter anderem auch auf Blasenkrebs [36]. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen eine starke Überexpression von HGF nach Druckbelastung in Detrusor-, nicht aber in Trigonumzellen. In Zusammenschau mit der aktuellen Literatur scheint es möglich, daß diese Vermehrte Expression von HGF eine Rolle bei der beschleunigten Karzinomentwicklung unter erhöhtem intravesikalem Druck spielt [17].

Zuletzt soll nun an dieser Stelle der PDGF und sein Rezeptor besprochen werden. Die hier dargestellten Ergebnisse lassen zunächst erkennen, daß der Ligand, also der PDGF-BB, in den untersuchten Zellkulturen nicht in nennenswertem Maße exprimiert wurde. Dies gilt sowohl für die Zellen, die Druck ausgesetzt wurden, als auch für die Kontrollzellen. Eine autokrine Aktivierung des PDGFR durch die Muskelzellen als unmittelbare Reaktion nach 1 Stunde Druck erscheint somit wenig wahrscheinlich. In der Literatur findet sich eine ähnliche Studie, die zu einem anderen Schluß kommt, nämlich einer autokrinen PDGF-Aktivierung. [60]

Fragwürdig werden die hier angeführten Daten dadurch indes nicht, da zum einen einige methodische Unterschiede bestehen. So wurde in der zitierten Arbeit mit einer längerfristigen Druckbelastung von 48h gearbeitet. Zudem wurden die untersuchten Zellkulturen aus glatten Muskelzellen von arteriellen Gefäßen von Ratten gewonnen. Zum anderen wurde die Expression der PDGF-Gene nicht quantitativ mittels qPCR gemessen, sondern es wurde lediglich indirekt auf eine Ausschüttung von PDGF durch die Zellkulturen unter Druckbelastung rückgeschlossen. Eine weitere experimentelle Studie kam zu dem Ergebnis, daß kultivierte Endothelzellen aus arteriellen Gefäßen unter Druckbelastung in erhöhtem Maße PDGF-BB ausschütten, was als ein Hinweis auf eine parakrine Stimulation der jeweiligen glatten Muskelzellen durch benachbarte Gewebe zu deuten ist [64]. Ähnlich kann man die Ergebnisse einer weiteren Arbeit interpretieren, in der nachgewiesen werden konnte, daß kultivierte Fibroblasten, diesmal aus der menschlichen Blase gewonnen, unter hydrostatischem Druck vermehrt PDGF-BB und PDGFRB exprimieren [62]. Auch in den beiden letztgenannten Arbeiten wurden jedoch für die Druckbelastung längere Zeiträume bis

zu 72h gewählt, so daß die Vergleichbarkeit mit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Akutreaktion der Zelle nur bedingt gegeben ist. In Zusammenschau von Literatur und hier erzielter Ergebnisse erscheint eine parakrine Stimulation glatter Blasenmuskelzellen unter Überdruck durch PDGF-Ausschüttung benachbarter Gewebe wie z.B. Fibroblasten oder Urothelzellen am wahrscheinlichsten.

Bezüglich der Expression der Untereinheiten des PDGF-Rezeptors zeigten die Resultate der vorliegenden Arbeit eine Überexpression beider Untereinheiten in Detrusorzellen nach 1 Stunde Druckbelastung, nicht aber in Trigonumzellen. Dieser Anstieg in der Expression deckt sich zum einen mit den Resultaten ähnlicher Studien an glatten Muskelzellen anderer Herkunft [61]. Zum anderen zeigen sie, daß die Überexpression des Rezeptors bereits nach sehr kurzer Zeit und nur im Detrusor, nicht aber im Trigonum stattfindet. Dies läßt sich dahingehend interpretieren, daß der PDGF-Rezeptor im klinischen Bild der druckinduzierten Hypertrophie und Hyperplasie des Detrusormuskels eine Rolle spielt und diesbezüglich – in Abgleich mit den im vorigen Absatz dargelegten Schlußfolgerungen – entweder eine parakrine Stimulation durch PDGF-Ausschüttung in Nachbargeweben stattfindet, oder eine ligandenunabhängige, mechanosensitive Aktivierung des Rezeptors, worauf sich ebenfalls Hinweise in der bisherigen Literatur finden [65]. Darüber hinaus scheint, zumindest in der kurzfristigen Reaktion der Muskelzelle, keine autokrine Stimulation der glatten Blasenmuskelzellen durch PDGF und keine PDGF-bezogene Antwort von Trigonumzellen nach mechanischer Belastung vorzuliegen.

Abschließend läßt sich somit folgende übergeordnete Hauptbeobachtung ableiten: Die glatten Muskelzellen aus dem Detrusor zeigen sich als „aktives“ Gewebe. Sie lassen sich durch Inkubation mit PDGF-BB gut zur Proliferation stimulieren und als Reaktion auf mechanischen Streß, wie er in vivo in Form erhöhten intravesikalen Drucks auftritt, wird die Expression von Wachstumsfaktoren und vor allem Wachstumsfaktorrezeptoren, insbesondere den beiden PDGF-Rezeptoruntereinheiten bereits kurzfristig gesteigert. Die ohnehin schon gute Stimulierbarkeit durch PDGF-BB nimmt also unter solchen Bedingungen weiter zu, so daß eine Beteiligung dieses Mechanismus an der Entstehung von Blasenmuskelhypertrophie und –hyperplasie wahrscheinlich ist. Aus dem Detrusor selbst scheint der Ligand allerdings nicht sezerniert zu werden, da er in den Zellen nicht exprimiert wird.

Das Trigonum hingegen erweist sich in den hier durchgeführten Experimenten als „inaktives“ Gewebe. Es ist im Vergleich mit dem Detrusor unempfindlich gegenüber Stimulation mit

PDGF-BB und zeigt nach Druckbelastung keine erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren, im Falle des PDGFRB sogar einen Rückgang der Expression

Dies deckt sich zum einen, wie oben erwähnt, mit der klinischen Beobachtung, daß die hypertrophe und hyperplastische Trabekulierung der Blasenmuskulatur nur den Detrusor betrifft und nicht das Trigonum vesicae. Zum anderen ergibt diese Beobachtung auch biologisch Sinn, da die hypertrophe Detrusormuskulatur die Blase auch gegen einen höheren Ausflußwiderstand entleeren kann und die Aussparung des Trigonum vesicae aus diesem Prozeß einer Stenosierung der Uretermündungen, die ja in diesem Bereich liegen, entgegenwirkt, so daß eine bedrohlicher Harnaustauung so lange wie möglich durch den Körper hinausgezögert wird.

6 Zusammenfassung

Die embryologische Anlage der menschlichen Harnblase unterteilt selbige in das Trigonum vesicae, welches die Uretermündungen und den Abgang der Urethra enthält und einen größeren restlichen Anteil, in dessen Wand die Detrusormuskulatur liegt, welche aktiv an der Blasenentleerung mitwirkt. Die Urodynamik der Harnblase kann durch verschiedene pathologische Prozesse gestört werden, unter anderem durch eine infravesikale Obstruktion, welche aufgrund des gestörten Abflusses einen erhöhten intravesikalen Druck zur Folge hat.

Als Reaktion der Blasenmuskulatur auf andauernd erhöhten intravesikalen Druck kommt es zu einer Hypertrophie und Hyperplasie, welche klinisch als Trabekulierung zu beobachten ist, es bildet sich die sog. „Trabekelblase“ aus. In der Klinik zeigt sich, daß diese geweblichen Umbauvorgänge vornehmlich die Detrusormuskulatur betreffen und nicht die Muskulatur im Bereich des Trigonum. Dies ist biologisch sinnvoll, da die hypertroph-hyperplastische Muskulatur gegen einen erhöhten Abflußwiderstand die Blase entleeren kann und gleichzeitig durch die fehlende Verdickung der Blasenwand im Bereich des Trigonum einer Stenose der Uretermündungen vorgebeugt wird. Beides trägt dazu bei, einen Harnstau hinauszuzögern.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen haben nun in Übereinstimmung mit der klinischen Beobachtung gezeigt, daß Detrusormuskulatur auf zellulärer Ebene zum einen empfindlich gegenüber Proliferationsstimulation mittels Wachstumsfaktoren sind, zum anderen auf erhöhte Druckbelastung mit der Steigerung der Expression bestimmter Wachstumsfaktoren und vor allem Wachstumsfaktorrezeptoren reagiert. Somit wird die Sensibilität gegenüber proliferationsfördernden Zytokinen unter diesen Bedingungen nochmals gesteigert. Im Gegensatz hierzu zeigten sich die Muskelzellen aus dem Trigonum unempfindlich gegenüber dem untersuchten Wachstumsfaktor und ohne nennenswerte Veränderung der Genexpression in den untersuchten Genen nach Druckbelastung.

Untersucht wurde zunächst die Stimulierbarkeit zur vermehrten Zellproliferation von Zellkulturen aus Detrusor- und Trigonumzellen, welche zuvor immunhistologisch als glatte Muskelzellen identifiziert worden waren, durch Inkubation mit PDGF-BB. Das Ausmaß der Zellproliferation in den Kulturen wurde mittels eines BrdU-Assays bestimmt. Hier zeigte sich

ab einer bestimmten Endkonzentration des Wachstumsfaktors eine deutliche Zunahme der Proliferation in Form vermehrter DNA-Synthese in Detrusorzellen, nicht, oder nur geringfügig in Trigonumzellen.

Hierauf aufbauend wurde mit den gleichen Zellkulturen die Veränderung in der Genexpression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren in Detrusor und Trigonumzellen mittels quantitativer realtime-PCR untersucht. Hierzu wurden die Zellen auf spezielle Zellkulturplatten mit flexiblem Boden ausgesät und nach vorheriger Konditionierung unter standardisierten Bedingungen mechanischem Streß in Form von erhöhtem hydrostatischem Druck ausgesetzt. Die relative Genexpression ohne und mit Druckbelastung wurde anschließend bestimmt und ins Verhältnis gesetzt. Auch hier zeigte sich eine deutliche Reaktion der Detrusorzellen in Form erhöhter Expression der Gene der PDGF-Rezeptoruntereinheiten, sowie des IGF1-Rezeptors und des HGF. In Trigonumzellen ließ sich keine vergleichbare Reaktion beobachten.

Somit konnten neue Erkenntnisse darüber gewonnen werden, welche molekularen Mechanismen an der unterschiedlichen Reaktion der verschiedenen Blasenanteile auf erhöhten hydrostatischen Druck beteiligt sind. Hervorzuheben ist hier die Rolle des PDGF, für den sowohl eine proliferationsfördernde Wirkung auf Detrusorzellen, als auch eine Erhöhung der Sensibilität auf PDGF in Form vermehrter Rezeptorexpression nach Druckbelastung gezeigt werden konnte. Die Wirkung auf Detrusorzellen bzw. die fehlende Wirkung auf Trigonumzellen scheint also eine zentrale Rolle in den o.g. Prozessen zu spielen. Ähnliches könnte auch für den IGF1 und seinen Rezeptor gelten, allerdings waren die diesbezüglichen Daten nicht ebenso aussagekräftig. Eine Expression beider Liganden konnte nicht nachgewiesen werden, so daß offen bleiben muß, woher die Wachstumsfaktoren stammen, die letztendlich zur Rezeptoraktivierung führen. Ob eine parakrine Sekretion, beispielsweise aus Urothelzellen vorliegt oder es sogar zu einer mechanosensitiven Autophosphorylierung des Rezeptors kommt, wird Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Ob die deutlich vermehrte Expression von HGF in Detrusorzellen nach Druckbelastung eine Rolle im Umbauprozess der Blasenmuskulatur spielt, kann an dieser Stelle nicht eindeutig beurteilt werden. Der in der Literatur beschriebene Zusammenhang von erhöhtem intravesikalem Druck und beschleunigtem Karzinomwachstum, sowie der vorbeschriebenen wachstumsfördernden Wirkung von HGF auf Blasenkarzinomzellen könnte diesbezüglich aber ebenfalls ein interessanter Ansatzpunkt künftiger Forschung sein.

7 Abkürzungsverzeichnis

ACTH	–	Adrenocorticotropes Hormon
ACVR2B	–	Activin receptor Type 2B
COX2	–	Cyclooxygenase 2
CTGF	–	Connective tissue growth factor
Cyr61	–	Cysteine rich, angiogenic inducer, 61
DAG	–	Diacylglycerin
EGF/-R	–	Epidermal growth factor /-receptor
FGF/-R	–	Fibroblast growth factor /-receptor
FLT1	–	Fms-related tyrosine kinase 1
HB-EGF	–	Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor
HGF/SF	–	Hepatocyte growth factor / scatter factor
IGF/-R	–	Insuline-like growth factor /-receptor
IGFBP	–	Insuline-like growth factor binding protein
InsP3	–	Inositol-1,4,5-triphosphat
Jak	–	Janus-Kinase
JNK	–	c-Jun N-terminale Kinase
KDR	–	Kinase insert domain receptor
LIF	–	Leukemia inhibitory factor

MAPK	–	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	–	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
NGFB	–	Nerve growth factor β
PDGF	–	Platelet-derived-growth-factor
PDGFR	–	Platelet-derived-growth-factor-receptor
PDK1	–	PIP3-dependent Kinase
PI3K	–	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	–	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	–	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PKB	–	Serin-Threonin-Proteinkinase B (auch: Akt-Kinase)
PKC	–	Serin-Threonin-Proteinkinase C
PLC- γ	–	Phospholipase C- γ
Ras/Raf	–	Rat sarcoma / rat fibrosarcoma
STAT	–	signal transducer and activator of transcription
TBP	–	TATA-Box-binding-protein
TGFA	–	Transforming growth factor α
VEGF	–	Vascular endothelial growth factor

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinen Eltern, die mir eine sorgenfreies Medizinstudium samt Promotion überhaupt erst ermöglicht haben. Desweiteren danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Maximilian Stehr für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Geduld im Laufe der Arbeit. Für die Betreuung im Labor, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Beratung in methodischen Fragen danke ich der gesamten AG Kappler der kinderchirurgischen Forschung am Dr.-v.-Haunerschen Kinderspital, namentlich Prof. Dr. Roland Kappler, Melanie Eichenmüller, Yvonne Gruner und Fatemeh Promoli. Indes gilt mein Dank natürlich nicht minder allen anderen, hier nicht namentlich aufgeführten Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die mich in meiner Arbeit stets unterstützt haben. Annika Herlemann danke ich für die engagierte Übernahme und Fortführung des Forschungsprojektes nach Abschluß meiner Arbeit. Bei den Kollegen der Pathologie der Universitätsklinik Ulm, namentlich Prof. Möller, bedanke ich mich für die Bereitstellung des Flexcell-Systems und die freundlichen Unterstützung bei dessen Nutzung, sowie bei Philipp Orthmann von der Sporthochschule Köln für die Beratung in Statistikfragen. Abschließend danke ich weiterhin allen Menschen aus meinem persönlichen Umfeld, die mich im Zuge von Studium und Promotion in mannigfaltiger Weise unterstützt haben und ohne die vieles bisher erreichte nicht möglich gewesen wäre.

Literaturverzeichnis

1. Bommas-Ebert, U., Teubner, Philipp , Voß, Rainer, *Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie*. 2006, Stuttgart [u.a.]: Thieme. 554.
2. Palmtag, H., Goepel, Mark , Heidler, Helmut *Urodynamik*. 2004, Berlin [u.a.] Springer. 258.
3. Putz, R., Sobotta, Johannes, *Anatomie des Menschen*. Vol. 22. 2007, München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer.
4. Trepel, M., *Neuroanatomie*. Vol. 4. 2008, München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer. 450.
5. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie*. 2006, München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer. 676.
6. Ulfig, N., *Kurzlehrbuch Histologie*. Vol. 2. 2005, Stuttgart [u.a.]: Thieme. 264.
7. Steffens, J., Siemer, Stefan Werner, *Häufige urologische Erkrankungen im Kindesalter*. 2000, Darmstadt: Steinkopff.
8. Ulfig, N., *Kurzlehrbuch Embryologie*. 2005, Stuttgart [u.a.]: Thieme.
9. Hautmann, R., Huland, Hartwig, *Urologie*. Vol. 3. 2006, Heidelberg: Springer. 565.
10. Klinke, R., Bauer, Christian, *Physiologie*. Vol. 5. 2005, Stuttgart [u.a.]: Thieme. 930.
11. Schmelz, H.U., *Facharztwissen Urologie, differenzierte Diagnostik und Therapie*. Vol. XXVI, 735 S. 2006, Heidelberg: Springer.
12. Kajbafzadeh, A., *Congenital urethral anomalies in boys. Part I: posterior urethral valves*. Urol J, 2005. **2**(2): p. 59-78.
13. Kajbafzadeh, A., *Congenital urethral anomalies in boys. Part II*. Urol J, 2005. **2**(3): p. 125-31.
14. Hammad, F.T. and V.A. Upadhyay, *Neonatal infravesical obstruction in females*. Saudi Med J, 2005. **26**(10): p. 1630-3.
15. Lee, S.D., et al., *Intravesical pressure induces hyperplasia and hypertrophy of human bladder smooth muscle cells mediated by muscarinic receptors*. J Pediatr Urol, 2006. **2**(4): p. 271-6.
16. Baskin, L., P.S. Howard, and E. Macarak, *Effect of physical forces on bladder smooth muscle and urothelium*. J Urol, 1993. **150**(2 Pt 2): p. 601-7.

17. Matsumoto, S., et al., *Bladder outlet obstruction accelerates bladder carcinogenesis*. BJU Int, 2008.
18. Berg, J.M., *Biochemie*, ed. L. Stryer. 2007, Heidelberg; München: Elsevier, Spektrum, Akad. Verl.
19. Löffler, G., *Biochemie und Pathobiochemie*. Vol. 8. 2007, Heidelberg: Springer. 1263.
20. Kohler, N. and A. Lipton, *Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity*. Exp Cell Res, 1974. **87**(2): p. 297-301.
21. Ross, R., et al., *A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(4): p. 1207-10.
22. Ronnstrand, L. and C.H. Heldin, *Mechanisms of platelet-derived growth factor-induced chemotaxis*. Int J Cancer, 2001. **91**(6): p. 757-62.
23. Betsholtz, C., L. Karlsson, and P. Lindahl, *Developmental roles of platelet-derived growth factors*. Bioessays, 2001. **23**(6): p. 494-507.
24. Andrae, J., R. Gallini, and C. Betsholtz, *Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine*. Genes Dev, 2008. **22**(10): p. 1276-312.
25. Hermanson, M., et al., *Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops*. Cancer Res, 1992. **52**(11): p. 3213-9.
26. Lokker, N.A., et al., *Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors*. Cancer Res, 2002. **62**(13): p. 3729-35.
27. Dai, C., et al., *PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo*. Genes Dev, 2001. **15**(15): p. 1913-25.
28. Uhrbom, L., et al., *Dependence of autocrine growth factor stimulation in platelet-derived growth factor-B-induced mouse brain tumor cells*. Int J Cancer, 2000. **85**(3): p. 398-406.
29. Homsy, J. and A.I. Daud, *Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors*. Cancer Control, 2007. **14**(3): p. 285-94.
30. Raines, E.W., *PDGF and cardiovascular disease*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(4): p. 237-54.
31. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.

32. Capdevila, J., et al., *Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer treatment*. Cancer Treat Rev, 2009. **35**(4): p. 354-63.
33. Iwamoto, R. and E. Mekada, *Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor*. Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(4): p. 335-44.
34. Chitnis, M.M., et al., *The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(20): p. 6364-70.
35. Jiang, W.G., et al., *Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies*. Crit Rev Oncol Hematol, 2005. **53**(1): p. 35-69.
36. Tamatani, T., et al., *Hepatocyte growth factor is an invasion/migration factor of rat urothelial carcinoma cells in vitro*. Carcinogenesis, 1999. **20**(6): p. 957-62.
37. Ornitz, D.M. and N. Itoh, *Fibroblast growth factors*. Genome Biol, 2001. **2**(3): p. REVIEWS3005.
38. Metcalf, D., *The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor*. Stem Cells, 2003. **21**(1): p. 5-14.
39. Brigstock, D.R., *The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family*. Endocr Rev, 1999. **20**(2): p. 189-206.
40. Levin, R.M., et al., *Update on bladder smooth-muscle physiology*. World J Urol, 1994. **12**(5): p. 226-32.
41. Mirone, V., et al., *The detrusor muscle: an innocent victim of bladder outlet obstruction*. Eur Urol, 2007. **51**(1): p. 57-66.
42. Karim, O.M., N. Seki, and J.L. Mostwin, *Detrusor hyperplasia and expression of "immediate early" genes with onset of abnormal urodynamic parameters*. Am J Physiol, 1992. **263**(6 Pt 2): p. R1284-90.
43. Tammela, T.L., et al., *The influence of acute overdistension on rat bladder function and DNA synthesis*. J Urol, 1993. **150**(5 Pt 1): p. 1533-9.
44. Orsola, A., et al., *The decision to undergo DNA or protein synthesis is determined by the degree of mechanical deformation in human bladder muscle cells*. Urology, 2002. **59**(5): p. 779-83.
45. Qian, J.S., et al., *[Static pressure induces vascular smooth muscle cells proliferation and apoptosis]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2005. **85**(29): p. 2062-4.
46. Chen, Y., et al., *Increase in insulin-like growth factor I in hypertrophying smooth muscle*. Am J Physiol, 1994. **266**(2 Pt 1): p. E224-9.
47. Chaqour, B., et al., *Mechanical regulation of IGF-I and IGF-binding protein gene transcription in bladder smooth muscle cells*. J Cell Biochem, 2002. **84**(2): p. 264-77.

48. Park, J.M., et al., *Stretch activates heparin-binding EGF-like growth factor expression in bladder smooth muscle cells*. Am J Physiol, 1998. **275**(5 Pt 1): p. C1247-54.
49. Park, J.M., et al., *AP-1 mediates stretch-induced expression of HB-EGF in bladder smooth muscle cells*. Am J Physiol, 1999. **277**(2 Pt 1): p. C294-301.
50. Adam, R.M., et al., *Mechanical stretch is a highly selective regulator of gene expression in human bladder smooth muscle cells*. Physiol Genomics, 2004. **20**(1): p. 36-44.
51. Park, J.M., et al., *Obstruction stimulates COX-2 expression in bladder smooth muscle cells via increased mechanical stretch*. Am J Physiol, 1999. **276**(1 Pt 2): p. F129-36.
52. Tamura, I., et al., *Regulation of Cyr61 gene expression by mechanical stretch through multiple signaling pathways*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **281**(5): p. C1524-32.
53. Chaqour, B., et al., *Cyr61 and CTGF are molecular markers of bladder wall remodeling after outlet obstruction*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(4): p. E765-74.
54. Chaqour, B. and M. Goppelt-Struebe, *Mechanical regulation of the Cyr61/CCN1 and CTGF/CCN2 proteins*. Febs J, 2006. **273**(16): p. 3639-49.
55. Nguyen, H.T., et al., *Cyclic stretch activates p38 SAPK2-, ErbB2-, and AT1-dependent signaling in bladder smooth muscle cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(4): p. C1155-67.
56. Persson, K., et al., *Protein kinase C in cyclic stretch-induced nerve growth factor production by urinary tract smooth muscle cells*. Am J Physiol, 1995. **269**(4 Pt 1): p. C1018-24.
57. Clemow, D.B., W.D. Steers, and J.B. Tuttle, *Stretch-activated signaling of nerve growth factor secretion in bladder and vascular smooth muscle cells from hypertensive and hyperactive rats*. J Cell Physiol, 2000. **183**(3): p. 289-300.
58. Stover, J. and J. Nagatomi, *Cyclic pressure stimulates DNA synthesis through the PI3K/Akt signaling pathway in rat bladder smooth muscle cells*. Ann Biomed Eng, 2007. **35**(9): p. 1585-94.
59. Estrada, C.R., et al., *Inhibition of EGFR signaling abrogates smooth muscle proliferation resulting from sustained distension of the urinary bladder*. Lab Invest, 2006. **86**(12): p. 1293-302.
60. Wilson, E., et al., *Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF*. J Cell Biol, 1993. **123**(3): p. 741-7.
61. Tanabe, Y., et al., *Mechanical stretch augments PDGF receptor beta expression and protein tyrosine phosphorylation in pulmonary artery tissue and smooth muscle cells*. Mol Cell Biochem, 2000. **215**(1-2): p. 103-13.

62. Akbal, C., et al., *Upregulation of both PDGF-BB and PDGF-BB receptor in human bladder fibroblasts in response to physiologic hydrostatic pressure*. J Pediatr Urol, 2006. **2**(5): p. 402-8.
63. Stehr, M., et al., *Platelet derived growth factor-BB is a potent mitogen for rat ureteral and human bladder smooth muscle cells: dependence on lipid rafts for cell signaling*. J Urol, 2003. **169**(3): p. 1165-70.
64. Dardik, A., et al., *Shear stress-stimulated endothelial cells induce smooth muscle cell chemotaxis via platelet-derived growth factor-BB and interleukin-1alpha*. J Vasc Surg, 2005. **41**(2): p. 321-31.
65. Hu, Y., et al., *Activation of PDGF receptor alpha in vascular smooth muscle cells by mechanical stress*. Faseb J, 1998. **12**(12): p. 1135-42.
66. Inui, H., et al., *Differences in signal transduction between platelet-derived growth factor (PDGF) alpha and beta receptors in vascular smooth muscle cells. PDGF-BB is a potent mitogen, but PDGF-AA promotes only protein synthesis without activation of DNA synthesis*. J Biol Chem, 1994. **269**(48): p. 30546-52.
67. Li, C. and Q. Xu, *Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells*. Cell Signal, 2000. **12**(7): p. 435-45.
68. Adam, R.M., et al., *Signaling through PI3K/Akt mediates stretch and PDGF-BB-dependent DNA synthesis in bladder smooth muscle cells*. J Urol, 2003. **169**(6): p. 2388-93.
69. Hasel, C., et al., *A cell-culture system for long-term maintenance of elevated hydrostatic pressure with the option of additional tension*. J Biomech, 2002. **35**(5): p. 579-84.